

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-502242

(43) 公表日 平成8年(1996)3月12日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/28		8318-4H	
A 6 1 K 39/395	A B A		
	A B E N	9284-4C	
		7729-4B	C 1 2 N 5/00
		9281-4B	15/00
			B
			C
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全100頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-500741
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)5月21日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)11月22日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 0 4 9 9 9
(87) 国際公開番号	W O 9 3 / 2 4 6 1 4
(87) 国際公開日	平成5年(1993)12月9日
(31) 優先権主張番号	0 7 / 8 8 7 , 6 9 5
(32) 優先日	1992年5月22日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)
(31) 優先権主張番号	0 8 / 0 6 4 , 5 0 5
(32) 優先日	1993年5月19日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	ザ リサーチ アンド ディベラップメン ト インスティテュート, インコーポレイテ ッド アメリカ合衆国59715 モンタナ州, ボー ズマン, ウェスト カレッジ ストリート 1711
(72) 発明者	ジュティラ, マーク エイ. アメリカ合衆国59715 モンタナ州, ボー ズマン, サンダンス ドライブ 3308
(74) 代理人	弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重付着分子に対する特異性を有する抗体

(57) 【要約】

本発明は、離れている別の分子上で見られる共通の決定基を認識するモノクローナル抗体に関する。これらのモノクローナル抗体は、細胞付着のブロッキングに用いられる。離れている別のセレクトイン上で発現した共通の決定基に結合することができるモノクローナル抗体、特にE-セレクトイン (ELAM-1としても知られている) およびL-セレクトイン (LAM-1、LECAM-1、Leu-8、TQ-1、gp90MEL14、および末梢リンパ節ホーミングレセプターとしても知られている) の両方に結合する抗体も記載される。これらのモノクローナル抗体は、炎症に関与する疾患の診断、治療および予防に有用である。モノクローナル抗体は、セレクトインを有する細胞を検出するのに用いられる。前記の抗体を産生することができる細胞系も記載する。

Applicants: David J. Pinsky et al.
Serial No.: 10/679,135
Filed: October 3, 2003
Exhibit 16

【特許請求の範囲】

1. E-セレクトインおよびL-セレクトインに見られる共通の抗原決定基を認識することができるモノクローナル抗体またはその抗原と結合するフラグメント。

2. ATCC登録番号HB11049号を有するハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体EL-246またはその抗原と結合するフラグメント。

3. 第一のセレクトイン分子を有する第一の細胞が第二のセレクトイン分子を有する第二の細胞に付着するのを抑制する方法であって、前記セレクトイン分子は異なるものであり、

第一の細胞が第二の細胞へ結合するのを防止するのに十分な量で抗体が細胞に結合する条件下で、前記細胞を請求の範囲第1項に記載の抗体または抗原と結合するフラグメントと接触させることを含む、方法。

4. セレクトインがE-セレクトインおよびL-セレクトインである、請求の範囲第3項に記載の方法。

5. モノクローナル抗体がATCC登録番号HB11049号を有するハイブリドーマによって分泌されるEL-246である、請求の範囲第3項に記載の方法。

6. 請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体を分泌する細胞系。

7. 請求の範囲第2項に記載のモノクローナル抗体を分泌するATCC登録番号HB11049号を有する細胞系。

8. E-セレクトイン及びL-セレクトインを有する細胞を含むことが考えられる生物学的試料中で該セレクトインを有する細胞を検出する方法であって、

(a) 試料を請求の範囲第1項に記載の抗体または抗原と結合するフラグメントと接触させて、E-セレクトインおよびL-セレクトインを有する細胞との免疫複合体を形成させ、

(b) 免疫複合体の存在を検出する、
ことを含む、方法。

9. 請求の範囲第8項に記載の方法を含む、炎症性疾患の診断法。

10. 白血球によって媒介される炎症状態にある哺乳類の体の任意の部分における炎症部位で起こる組織の損傷を減少させることを目的とする哺乳類の治療法であって、

白血球および内皮細胞の表面で発現したセレクチン分子に特異的に結合するのに十分な量のモノクローナル抗体をイン・ビボで投与して、前記細胞の付着を抑制することを、

含む方法。

11. 前記炎症部位が身体の脈管内皮細胞界面または細胞下マトリックスにある、請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 前記炎症部位が身体の内皮組織を含んでいる、請求の範囲第10項に記載の方法。

13. 前記炎症部位が身体の関節にある、請求の範囲第10項に記載の方法。

14. 前記炎症部位が心筋梗塞により生じたものである、請求の範囲第10項に記載の方法。

15. モノクローナル抗体を、炎症性条件にまたはその期間中選択された時間に静脈内投与する、請求の範囲第10項に記載の方法。

16. 前記モノクローナル抗体がL-セレクチンおよびE-セレクチンを発現する細胞に結合するがP-セレクチンには結合しない、請求の範囲第10項に記載の方法。

17. 炎症条件にある哺乳類の体の炎症部位で起こる組織の損傷を減少させることを目的とする哺乳類の治療法であって、

前記炎症条件の前または中に白血球の表面上で表現するショートコンセンサス領域上で発現したエピトープに特異的に結合するのに十分な量であり且つ前記の損傷に関与する免疫学的反応の機能を反映している白血球の付着依存性の細胞間反応を抑制するモノクローナル抗体を身体に投与することを含む方法。

18. 請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体または抗原と結合するフラグメント、および製薬上許容可能なキャリアを含んでなる、医薬粗製物。

19. 抗体または抗原と結合するフラグメントがP-セレクチンに結合しない

請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体または抗原と結合するフラグメント。

20. 抗体または抗原と結合するフラグメントが、ヒト、ヒツジ、ヤギ、ウシ、およびブタのL-セレクトリンに選択的に結合する、請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体または抗原と結合するフラグメント。

21. 抗体または抗原と結合するフラグメントが、内皮細胞層上の白血球のローリングを抑制することができる、請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原と結合するフラグメント。

22. 抗体または抗原と結合するフラグメントが、末梢組織上への白血球のホーミングを抑制することができる、請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原と結合するフラグメント。

23. 抗体または抗原と結合するフラグメントが、ヒト、ヒツジ、ヤギ、ウシ、およびブタの炎症性反応を抑制することができる、請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原と結合するフラグメント。

24. (a) 哺乳類をE-セレクトリン、L-セレクトリン、またはE-セレクトリンとL-セレクトリンとの組合せからなる免疫原で感作させ、
(b) 感作した哺乳類から得られるリンパ球をミエローマ細胞と融合させ、
(c) L-セレクトリンおよびE-セレクトリン上で共通の抗原決定基を認識する抗体を分泌するハイブリッド細胞を選択し、
(d) この抗体を単離する、

ことを含む工程によって産生されるE-セレクトリンおよびL-セレクトリンに見られる共通の抗原決定基を認識することができるモノクローナル抗体。

25. (a) 哺乳類をE-セレクトリン、L-セレクトリン、またはE-セレクトリンとL-セレクトリンとの組合せからなる免疫原で感作させ、
(b) 感作した哺乳類から得られるリンパ球をミエローマ細胞と融合させ、
(c) L-セレクトリンおよびE-セレクトリン上で共通の抗原決定基を認識する抗体を分泌するハイブリッド細胞を選択し、

(d) この抗体を単離する、
ことを含むE-セレクトインおよびL-セレクトイン上の共通の抗原決定基に結合する
ことができるモノクローナル抗体の産生法。

26. 哺乳類の部位で炎症性反応を防止または抑制する方法であり、モノクローナル抗体または抗原と結合するそのフラグメントの有効量を投与することを含み、前記抗体または抗原と結合するフラグメントはL-セレクトインおよびE-セレクトインと結合することができ、前記の量が部位の炎症性反応を防止または抑制する上記方法。

27. 部位を、心臓、肺、関節、脳、四肢、血管、リンパ節、脾臓、坐傷部位、脊髄、または移植部位からなる群から選択される、請求の範囲第26項に記載の方法。

28. 炎症性反応が心筋梗塞、ショック、発作、臓器移植、坐傷、四肢再移植、凍傷または肺虚血／再灌流による損傷によって引き起こされる、請求の範囲第26項に記載の方法。

29. モノクローナル抗体が、ATCC登録番号HB11049号を有する細胞系によって分泌されるEL-246と同様な反応性パターンを有する、請求の範囲第26項に記載の方法。

30. 内皮細胞層上の白血球ローリングを防止または抑制する方法であって、

白血球または内皮細胞層を所定量の請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体または抗原と結合するフラグメントで処理することを含み、前記の量が白血球のローリングを防止または抑制するのに有効である上記方法。

31. 内皮細胞層が、リンパ管、動脈、静脈または後毛細管小静脈中にある、請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 哺乳類の末梢組織へのリンパ球のホーミングを防止または抑制する方法であって、

請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体または抗原と結合するフラグメントの有効量を投与することを含み、この量により、リンパ球が血液から末梢組

織へホーミングするのを防止しまたは抑制する、
上記方法。

33. 末梢組織がパイアー班、腸間膜リンパ節、末梢リンパ節または脾臓である、請求の範囲第32項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

多重付着分子に対する特異性を有する抗体

関連出願についてのクロスリファレンス

本出願は、1992年5月22日出願の係属米国出願連続番号第07/887, 695号の一部継属出願である。

発明の分野

本発明は、多重付着分子に結合する抗体および疾患の治療法に関する。本発明のもう一つの特徴は、付着分子を検出するためのイムノアッセイに関する。

発明の背景

ヒトおよび哺乳類の循環器系における末梢血は、主として赤色血液細胞、すなわち赤血球と、白色血液細胞、すなわち白血球とからなっている。白血球の群は、単球、好中球、好酸球、好塩基球および各種のリンパ球からなっている。好中球、好酸球および好塩基球は、細胞質顆粒の貧量が高いため、「顆粒細胞」として知られている。

好中球、単球、好酸球および好塩基球は、ヒト免疫系におけるそれらの主要な機能が細菌、微生物および他の種類の異物を貪食または消化するので、食細胞として知られている。これらの細胞はヒトまたは動物の骨髄中の通常の前駆細胞から産生され、末梢血中を循環し、最後に感染を抑制するのに必要な組織に入り、または炎症反応に関与することが知られている。しかしながら、それぞれの食細胞は機能が異なり、関連してはいるが別個の系として機能する。

好中球は、ヒトおよび動物の末梢血における最も一般的に見られる白血球である。正常なヒトの全血1マイクロリットルは、平均して5,000個の白血球を含み、その3,075個が好中球であり、150個が好酸球であり、25個が好塩基球であり、250個が単球であり、1,500個がリンパ球である。

感染または炎症に応答して、白血球は活性化されて、最初にある種の細菌の産

生物、補体成分、サイトカインおよび他の因子などの走化性因子に応じて適当な場所へ移動する。白血球の他に、これらのシグナルは内皮細胞を活性化することもできる。活性化の結果として、白血球および内皮細胞は付着性になる。

この誘引工程は「走化性」と呼ばれている。ある部位に炎症または感染が生じると、ほとんどの白血球はその標的に堅く結合しなければならない。細胞付着は、様々なリガンド-レセプター相互作用を介して行われる。例としては、補体用の細胞レセプター、抗体のFcまたは細胞結合性部分の細胞レセプター、フィブロネクチンレセプター、および他の付着分子が挙げられる。付着に関与するレセプターの大半は、糖タンパク質である。

好中球は、後毛細管小静脈の内皮を通して動脈-静脈系と相互作用し、この系から出て行く（すなわち、溢出する）。急性の炎症性反応の際には、好中球はリンパ球溢出の主要部位であるリンパ球節内に見られる高内皮性小静脈（HEV）から出ることができる。二種類の好中球表面抗原が、この相互作用に関与していることが示されている-LFA-1/Mac-1/p150.95（CD11a-c/CD18）複合体およびL-セレクチン。

セレクチンは以前はLEC-CAMsと呼ばれていたものであり、新規な種類の付着タンパク質を表しリンパ系組織および炎症部位へ白血球が入るのを制御する（ローゼン（Rosen）、1990年、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 3:397-402）。この群の3個が同定されている。これらのうち、2個のE-セレクチンおよびP-セレクチン（最初は、それぞれELAM-1およびGMP-140/PADGEMと呼ばれていた）は、内皮細胞によって発現される。第三のL-セレクチン（LAM-1、LECAM-1、Leu-8、TQ-1、または末梢リンパ節ホーミングレセプター）は、実質的に総ての末梢血白血球によって発現される。P-セレクチンは、内皮細胞および血小板中の細胞質性タンパク質であり、トロンビンで活性化して速やか（数分以内）にトランスロケーションすることができる（ラルセン（Larsen）ら、1989年、Cell, 56:1033-1044；ジェング（Geng）ら、1990年、Nature（London）, 343:757-760）。E-セレクチンも誘導内皮細胞表面糖タンパク質であるが、発現には2～4時間かかり、de

novorNAおよびタンパク質合成の要件を反映している（ベビラッカ（Bevilacqua）ら、1989年、Science（Wash. D. C.）243:11

6-1112)。

P-セレクトインおよびE-セレクトインは両方とも好中球および単球に対する付着タンパク質である (ラルセン (Larsen) ら、1989年、Cell, 59:305-312; ジョンストン (Johnston) ら、1989年、Cell, 56:1033-1044; ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci., 84:9238-9242; ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1989年、Science (Wash. D. C.) 243:1160-1112)。記憶T-細胞のサブ集団も、E-セレクトインと結合することが示されている (ピッカー (Picker) ら、1991年、Nature (London), 349:796-799); (シミズ (Shimizu) ら、1991年、Nature (London), 349:799)。血管系セレクトインとは対照的に、L-セレクトインは白血球によって構造的に発現され、末梢血管アドレッシングに結合することによって末梢リンパ節の高内皮性小静脈へのリンパ球の付着 (ベルグ (Berg) ら、1989年、Immunol. Rev., 108:5-18; ベルグ (Berg) ら、1991年、J. Cell. Biol., 114:343-349)、およびサイトカインによって活性化された内皮細胞への好中球の付着を媒介する (ホールマン (Hallman) ら、1991年、Biochem. Biophys. Res. Comm., 174:236-243; スミス (Smith) ら、1991年、J. Clin. Invest., 87:609-618; スペルチニ (Spertini) ら、1991年、J. Immunol., 147:2565-2573)。最近になり、好中球のL-セレクトインはE-セレクトインの潜在的な逆レセプターであることが示された (キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Blood, 78:805-811; ピッカー (Picker) ら、1991年、Cell, 66:921-933)。

L-セレクトインは、見かけは機能的な形態の残りの好中球上で構造的に発現する。新たに単離した好中球は、イン・ビトロで低温 (4~7℃) で刺激した内皮に結合することができる (ホールマン (Hallmann) ら、1991年、

Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 236:

スベルチニ (Spertini) ら、1991年、J. Immunol., 147:2565)。しかしながら、好中球を低濃度の走化性因子に数分間暴露するだけで、L-セ렉チンは細胞表面から速やかにダウンレギュレーションする (キシモト (Kishimoto) ら、1989年、Science, 245:1238)。L-セ렉チンのほぼ完全なダウンレギュレーションは、イン・ビトロでは数分以内に検出することができる。この形態の逆レギュレーションは、細胞表面上のL-セ렉チンのタンパク質分解性分解によって行われる。L-セ렉チンの大きなフラグメントは、活性化した細胞の上清から回収することができ、L-セ렉チンはトランスメンブランドメインの近傍にタンパク質分解的にクリップされることを示唆している (キシモト (Kishimoto) ら、1989年、Science, 245:1238)。

イン・ビボで炎症を起こしたマウスの腹膜から回収される好中球を分析し、炎症を起こした皮膚部位における好中球を免疫組織学的に分析することにより、この付着分子の逆レギュレーションがイン・ビボでも起こることが示唆されている。リンパ球および単球も、イン・ビボでは活性化することによりL-セ렉チンを脱落することができるが、速度は著しく遅い (ジュング (Jung) ら、1988年、J. Immunol., 141:4110; ジュチラ (Jutila) ら、1990年、Blood, 76:178; キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244)。

E-セ렉チンは、通常は内皮細胞には存在しない。しかしながら、炎症性サイトカインで刺激することにより、内皮細胞は数時間以内にE-セ렉チンを発現する。E-セ렉チンは、テ・ノボで合成され、タンパク質合成阻害剤によってブロックされる (ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:9238)。E-セ렉チンのこのアップ・レギュレーションは、ICAM-1およびVCAM-1などの他の内皮付着分子で見られるものと同じである。しかしながら、24時間に亘って高度に発現され続けるこれらの他の付着分子とは対照的に、E-セ렉チンの発現はイン・ビトロでは3～4時間で最大になった後、8～24時間までに低下する。

(ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 34:9238; ポバート (Pobert) ら、1986年、J. Immunol., 137:1893)。E-セレクトインの発現の時間経過は、イン・ビボでの急性の炎症部位への好中球の浸潤の時間経過と同様である。これらの結果から、E-セレクトインは主として急性の炎症反応に関与していることが示唆される。E-セレクトインの発現もイン・ビボで速やかに誘導することができ、好中球の流入と一致する (ノリス (Norris) ら、1991年、J. Invest. Dermatol., 96:763; コトラン (Cotran) ら、1986年、J. Exp. Med., 164:661; ムンロ (Munro) ら、1991年、Lab Invest., 64:295; レドル (Redl) ら、1991年、Am. J. Pathol., 139:461; ムンロ (Munro) ら、1989年、Am. J. Pathol., 135:121; ロイグ (Leung) ら、1991年、J. Clin. Invest., 87:1805)。しかしながら、幾つかの慢性の炎症性病変、特に幾つかの炎症を起こした皮膚および滑膜部位では、E-セレクトインの発現が極めて顕著である (コトラン (Cotran) ら、1986年、J. Exp. Med., 164:661; コッホ (Koch) ら、1991年、Lab. Invest., 64:313; ピッカー (Picker) ら、1991年、Nature, 349:746; ノリス (Norris) ら、1991年、J. Invest. Dermatol., 96:763)。L-セレクトインとは異なり、E-セレクトインが内皮から脱落することを示唆するイン・ビトロでの証拠はない。

分子レベルでは、これらの3種類のセレクトインは総て、N-末端のC型レクチンドメイン、表皮成長因子 (EGF) 様ドメイン、および補体調節タンパク質中に見られるものに対応する多重短コンセンサス反復 (SCR) ドメインからなる特異的なモザイク構造を示す (ジョンストン (Johnston) ら、1989年、Cell, 56:1033-1044; ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:9238-9242; ラスケイ (Laskey) ら、1989年、Cell, 56:1045-1055; シーゲルマン (Siegelman) ら、1989年、Science (Wash. D.

C.) 243:1165-1172; カメリニ (Camerini) ら、1989年、*Nature (London)* 342:78-80; テッダー (Tedder) ら、1989年、*J. Exp. Med.*, 170:123-133)。これらのタンパク質はヌクレオチドおよびアミノ酸レベルで40~60%同じものを共有しており、初期の祖先遺伝子の遺伝子複製によって生じることがある。それぞれのセレクトインのレクチンドメインはタンパク質の付着機能にとって重要であると考えられており、これら3種類のセレクトインの炭水化物結合特異性は部分的に画定されている。P-およびE-セレクトインは、それらの結合特性には差があるが、ミエロイド細胞によって発現した糖タンパク質および糖脂質を修飾するシアリル化したルイスx (sLex) を認識する (フィリップス (Phillips) ら、1990年、*Science (Wash. D. C.)*, 250:1130-1132; ロウエ (Lowe) ら、1990年、*Cell*, 63:475-484; ゲルツ (Goetz) ら、*Cell*, 63:1349-1356; ワルツ (Walz) ら、1990年、*Science*, 250:1132; ポーレイ (Polley) ら、1990年、*Natl. Acad. Sci.*, 8:6224-6228)。L-セレクトインの機能は、マンノース-6-PO₄などのある種の単純な糖、および酵母 (*Hansenula holstii*、イエドノック (Yednock) ら、1987年、*J. Cell. Biol.*, 111:1225-1232、ローゼン (Rosen)、1990年、*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* の総説) 由来のマンノース-6-PO₄含量の高いホスホマンナン (ホスホマンナンモノエステルコア、すなわちPPME) などのある種の複雑な多糖類によってブロックされる。更に、L-セレクトインの機能をブロックする多くの抗体がレクチンドメインによってコードされたエピトープを認識する (ボウエン (Bowen) ら、1990年、*J. Cell. Biol.*, 110:147-153; カンサス (Kansas) ら、1991年、*J. Cell. Biol.*, 114:351-358)。

セレクトインの他の空間的に離れた別の機能ドメインも存在することができる。マウスまたはヒトL-セレクトインEGFドメインに対する抗体は、HEVに対するリンパ球の付着をブロックするが、炭水化物の結合に関してはほとんど効果が

ない (カンサス (Kansas) ら、1991年、J. Cell. Biol., 114 : 351-358 ; シーゲルマン (Siegelman) ら、1989年、Cell, 61 : 611-622)。キメラL-セレクトイン/免疫グロブリン構造体の研究から、SCRドメインもセレクトインに対して重要な機能上の役割を有することが示されているが、レクチンおよびEGFドメインとは対照的に、機能をブロックする抗体がこの領域を認識することは示されていない。また、SCRの機能上の役割は適正な分子のコンホーメーションの保持に限定されており、このコンホーメーションはそれぞれのセレクトインについて異なっている (ワトソン (Watson) ら、1991年、J. Cell. Biol., 115 : 235-243)。

多くの抗-セレクトインmAbsが開発されているが、2種類の異なるセレクトインに対する決定基を認識する能力を有することは示されていない。ヒトE-セレクトインを認識するCL2はイヌL-セレクトインと反応するが、同じ動物ではいずれとも反応しない (アバッシ (Abbassi) ら、1991年、J. Immunol., 147 : 2107-2115)。スペルチニ (Spertini) ら (1991年、J. Immunol., 147 : 942) は、L-セレクトインに関して少なくとも11種類の異なるエピトープの機能上の特徴と分子での局在化を示しているが、これらのいずれも2種類の異なるセレクトイン上では発現しない。L-セレクトインを認識するTQ-1およびLeu-8も極めて限定された染色パターンを示すが、他のセレクトインを染色しない。公表された抗-E-セレクトインまたはP-セレクトインmAbsのいずれも、他のセレクトインと反応することが示されていない。様々なセレクトインはアミノ酸レベルではかなりの程度同一であり、多数の抗-セレクトインmAbsが産生されているが、本発明の以前には2種類の異なるセレクトインによって共有されるエピトープを認識する抗体は全く報告されていなかったことは興味深いことである。

急性の炎症反応の主要なメディエーターとして、好中球は免疫系の本質的成分を表している。好中球は骨髄で生成するが、この骨髄には多量の容易に移動性になる成熟した顆粒細胞が含まれている。好中球は、血中に放出された後は、半減期が比較的短く (ヒトでは4~10時間)、内皮と可逆的に相互作用する細胞の自由に血中を運ばれるプールとマージネイティグ (marginating)

プールとの間で動的平衡になっている。好中球は急性の炎症性刺激に応じて、血管内皮に堅く付着し、血管壁を通過して移動した後、走化性グラディエントに沿って炎症性刺激へと移動して、そこで食細胞作用を行う。従って、好中球と血管内皮細胞との相互作用は、急性の炎症性反応における本質的な初期段階である。

白血球の炎症反応は微生物の侵襲を撲滅する上で極めて重要であるが、実質的で納得できる証拠によれば、炎症性食細胞は刺激的病因によって生じる可溶性炎症因子によってイン・ビボでこれらの細胞が活性化されると、各種の器官および組織に損傷を与えるのである（ハーラン (Harlan)、1985年、Blood, 65:513-525）。活性化された好中球および単核食細胞が管内皮細胞に付着して広がった後、毒性を有する酸化性代謝物およびプロテアーゼを放出すると、成人の呼吸困難症候群（ARDS；ショック肺症候群）、糸球体腎炎、急性および慢性の同種移植片拒絶反応、炎症性皮膚疾患、リウマチ性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、全身性エリテマトーデス、結合組織疾患、脈管炎、および虚血-再灌流症候群（すなわち、四肢再移植（limb replantation）、心筋梗塞、挫傷、ショック、発作および臓器移植）などの疾患に見られる臓器の損傷が引き起こされた（ハーラン (Harlan) の総説、同上）。

「抗-付着（anti-Adhesion）」療法は、白血球の内皮への付着が管および組織の障害／損傷に大きく関与する炎症性および免疫疾患の治療に対する新規な方法である。本発明は付着工程と特異的に相互作用してこれをブロックするので、これらの疾患に用いられる可能性がある。

「抗-付着」療法は、炎症反応に対して極めて大きな効果を有する。皮膚障害を減少させることができ（Arfors）ら、1987年、Blood, 69:338）、細菌性髄膜炎により引き起こされる脳水腫および死を減少させることができ（ツォマネン (Tuomanen) ら、1989年、J. Exp. Med., 170:959）、遅延型過敏反応に伴う組織浮腫を減少させることができ（リンドボム (Lindbom) ら、1990年、Clin. Immunol. Immunopath., 57:105）、アレルギー性喘息の気管過敏症を減少させることができ（ウェグナー (Wegner) ら、1990年、Science,

247:456)、吸引後の遠隔肺損傷を減少させることができ(ゴールドマン(Goldman)ら、1991年、FASEB J., 5:A509)、抗原が作用した後の後期気管支収縮を減少させることができ(グンデル(Gundel)ら、1991年、J. Clin. Invest., 88:1407)、急性肺炎の透過性水腫を減少させることができ(ムリガン(Mulligan)ら、1991年、J. Clin. Invest., 88:1396)、自己免疫性糖尿病の進行を抑制することができる(ハッチングス(Hutchings)ら、1990年、Nature, 346:689)。「抗-付着」療法はまた、管の同種移植片の生存期間を引き延ばすことができ(フラビン(Flavin)ら、1991年、Transplant. Proc., 23:533)、酸素の毒性に伴う肺の損傷および機能障害を減少させ(ウェグナー(Wegner)ら、1991年、Am. Rev. Respir. Dis., 143:A544)、腎臓の同種移植片の拒絶反応を減少させ(コシミ(Cosimi)ら、1990年、J. Immunol., 144:4604)、抗原によって誘発される関節炎を改善し(ジャシン(Jasin)ら、1990年、Arthritis Rheum., 33:S34)、内毒素ショックでの脈管を損傷および死から保護し、2度火傷が3度火傷になるのを防止することもできる(バックキー(Bucky)ら、1991年、Proc. Amer. Burn Assoc., 23:133)。

このような「抗-付着」療法は、虚血および再灌流による損傷にも有効である。このような療法を用いて、小腸の虚血-再灌流に伴う透過性水腫を減少させ(ヘルナンデツ(Hernandez)ら、1987年、Am. J. Physiol., 253:H699)、心筋梗塞に伴う心筋の損傷を減少させ(ウィンキスト(Winqvist)ら、1990年、Circulation, 82:III;マー(Ma)ら、1990年、Cir. Res., 82:III)、出血性ショックに伴う脈管および臓器の損傷を減少させ(ミレスキー(Mileski)ら、1990年、Surgery, 108:206)、脊髄のI/Rに伴う中枢神経系の損傷を減少させ(クラーク(Clark)ら、1991年、Stroke, 22:877)、凍傷および復温に伴う水腫および臓器の損傷を減少させ(ミレスキー(Mileski)ら、1990年、Proc. Am. Burn Assoc., 22:164)、心筋

層のI/Rに伴う梗塞の大きさを減少させることができる（シンプソン（Simpson）ら、1990年、Circulation, 81:226）。

L-セ렉チンに対するモノクロナル抗体は、好中球が炎症を起こした皮膚へ移出するのを防止し（レビンゾーン（Lewinsohn）ら、1987年、J. Immunol., 138:4313）、好中球および単球が炎症によって生じた腹水中に移出するのを防止し（ジュティラ（Jutila）ら、1989年、J. Immunol., 143:3318）、好中球が炎症を起こした腹膜中へ移出するのを抑制する。E-セ렉チンに対するモノクロナル抗体は、好中球が肺へ移行するのを抑制することにより、それらを喘息の予防または治療に使用する基礎となっている（グンデル（Gundel）ら、1991年、J. Clin. Invest. ; ムリガン（Mulligan）ら、1991年、J. Clin. Invest., 88:1396）。ジャシン（Jasin）らは、他の特異的な細胞効果の中でも炎症を起こした滑膜に好中球が蓄積するのを抑制するのに抗体を用いることを支持している（ジャシン（Jasin）ら、1990年、Arthritis Rheum., 33:S34; コッホ（Koch）ら、1991年、Lab. Invest., 64:313）。

様々なセ렉チン分子によって共有されているエピトープまたは抗原決定基と反応するモノクロナル抗体またはその活性フラグメントであって、これにより炎症および免疫反応に関係した多くの疾患を効果的に診断し、予防し、治療することができるようにするものを製造することが長年にわたり必要とされている。複数のこの群の細胞付着分子を認識することにより前記のような疾病および損傷に更に広範に適用することができるmAbsを入手できれば有益である。

発明の要約

本発明は、様々な付着分子上に存在するドメインと反応する抗体、抗体の抗原に結合するフラグメント、およびそれらと生物学的に同等なもの、およびこれらの抗体を産生する細胞に関する。

本発明は、様々なセ렉チン上に存在するドメインと反応する抗体、抗体の抗原に結合するフラグメント、およびそれらと生物学的に同等なもの、およびこれ

らの抗体を産生する細胞にも関する。

本発明の抗体は様々なセレクチンと反応し、様々なセレクチンを運びまたは発現する細胞を含んでいる。

これらの抗体、抗体の抗原に結合するフラグメントおよびそれらの生物学的に同等なものは、様々なセレクチンを運びまたは発現する細胞に結合し、様々なセレクチンの機能を抑制する。

本発明は、セレクチンが役割を果たす疾患を予防または治療する治療薬としてこれらの抗体を使用することにも関する。これらの疾患には、炎症性疾患、アレルギー、自己免疫疾患、喘息、関節炎および虚血-再灌流による損傷が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特に興味深いのは、これらの抗体またはそれらの機能的に同等なものを有効量で使用して、肺の虚血-再灌流による損傷を防止または抑制することである。このような治療は、前記のような疾患に罹っている哺乳類の死亡率を減少させるのにも有効である。

本発明は、様々なセレクチンを運びまたは発現する細胞を検出する方法も包含する。このような方法は、セレクチンおよびセレクチンを運ぶ細胞が役割を果たす疾患の診断、およびこのような疾患の進行状態を観察するのに用いられる。

このような方法は、セレクチンおよびセレクチンを運ぶ細胞が役割を果たす疾患の治療経過中における治療薬の有効性を観察するのに用いられる。

本発明は、E-セレクチンおよびL-セレクチン上の共通の抗原決定基を認識する抗体、抗原に結合するフラグメントおよびキメラ抗体を包含する。本発明の抗体およびそれらと機能的に同等なものは、E-セレクチンおよびL-セレクチンによって媒介される細胞-細胞相互作用を抑制することができる。

本発明は、好中球がE-セレクチンを発現することができる細胞に結合するのを抑制することができしかもE-セレクチンを発現する内皮細胞層上で好中球がローリングするのを防止または抑制することができる抗体およびそれらの機能的に同等なものである。

本発明は、末梢リンパ球様組織にリンパ球が戻るのを防止し、抑制または調節することができる抗体またはそれらと機能的に同等なものである。

図面の簡単な説明

本発明の上記および他の目的、特徴および付随する利点は、添付の図面に就いて考察するとき、下記の詳細な説明を読むことによって一層よく理解されるであろう。

図1：ヒトE-セレクトインcDNAでトランスフェクションしたL1-2細胞のEL-246染色を示す。矢印は棒グラフを示しており、(1) L1-2 ELAMのEL-246染色、(2) L1-2トランスフェクタントコントロール、および(3) L1-2 ELAMトランスフェクタントのバックグラウンド染色(第二段階コントロール)である。

図2：L1-2 ELAM細胞によって発現される110 kD抗原のEL-246認識を示す。各プロットはEL-81(抗-E-セレクトイン、レーン3)、EL-246(レーン2)およびネガティブコントロール抗体(レーン1)でプローブした。

図3：ヒト扁桃の凍結切片における炎症を起こした小静脈のEL-246による認識を示す。

図4：ヒト末梢血白血球の表面抗原のEL-246による認識を示す。

図5：EL-246と抗-L-セレクトイン抗体との同時染色を示す。

図6：EL-246がウェスタンプロットでのアフィニティークロマトグラフィにより精製したL-セレクトインを認識することを示す。L-セレクトインは、DREG56抗-L-セレクトインmAbを用いて非還元条件下で8% SDSゲル上でアフィニティークロマトグラフィによって精製し、ニトロセルロースに移し、EL-246(レーン2)、mAb(DREG152)中のもう一つの抗-L-セレクトイン(レーン3)または第二段階の抗体コントロール(レーン1)でプローブした。

図7：EL-246がL-セレクトイン(A)およびE-セレクトイン(B)の機能をブロックすることを示す。

図8：EL-246エピトープの位置がL-セレクトインのSCRドメイン中にあるかまたはこのドメインを必要とすることを示している。

図9：好中球のEL-246治療により、好中球がE-セレクトイントランスフ

ェクタント (TF) に結合するのを防止する。

図10: EL-246は、結合分析の際に好中球からE-セレクトントランスフェクタントへ移行する。図10Aは、EL-246で治療した好中球は分析前にFITC-第二段階で明るく染色されることを示している。図10Bは、分析後に同じ細胞のFITC-第二段階の抗体の染色が見られないことを示している。図10cは、10Bで分析した細胞が第二の抗-L-セレクトインmAb (DREG56) で染色されることを示している。図10Dは、分析前にFITC-第二段階によりE-セレクトントランスフェクタントの染色がみられないことを示しており、図10Eは、分析後の染色を示している。図10Fは、E-セレクトインに対するトランスフェクタントの通常の間接染色の結果を示している。それぞれの棒グラフの点線はネガティブコントロール抗体で染色した後のバックグラウンド蛍光を示している。

図11: EL-246は、剪断条件下で活性化した内皮細胞上で好中球がローリングするのをブロックする。11Aは、好中球のローリングに対するEL-246の効果を示している。11Bは、好中球のローリングに対するイソタイプのネガティブコントロールmAbの効果を示している。

図12: EL-246は、末梢リンパ節HEVに対するE-セレクトントランスフェクタントの結合をブロックする。図12AはPLN HEVに対するこのトランスフェクタントの結合を示し、図12Bは連続切片での同じ血管への結合に対するEL-246の効果を示している。矢印は、連続切片倍率200×での同一血管を示している。

図13: EL-246は、ウシリンパ球がマウスの末梢リンパ節へ戻る能力を特異的にブロックする。輪郭プロットは、EL-246、DREG55または媒質のみ (コントロール) で処理した (trtd.) 後に脾臓および末梢リンパ節 (PLN) に戻ったFITCで標識したウシリンパ球の割合を分析したものを表している。

図14: ヒツジをEL-246で処理すると、イン・ビボで虚血/再灌流による損傷によって引き起こされる死亡が防止される。ヒツジは、抗-E/L-セレクトイン (EL-246) モノクローナル抗体、抗-ヒトL-セレクトインモノクロ

ーナル抗体 (DREG 56) で処理したか、または全く処理を行わなかった (虚血コントロール)。生存率を時間 (時) に対してプロットした。

図15: 抗-E-/L-セ렉チンモノクローナル抗体 (EL-246) で処理した8尾のマウスで再灌流を開始した後、30、90および360分後に採取した血清試料の希釈物で処理したL-セ렉チン cDNA をトランスフェクションしたマウスの最大蛍光染色の割合を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、離れており且つ別種の付着分子上に見られる共通の抗原決定基またはエピトープに結合するモノクローナル抗体 (mAbs)、抗原に結合するフラグメントおよびそれらと機能的に同等のものを包含している。本発明は、離れており且つ別種の付着分子上に存在する共通の抗原決定基を認識することができる mAbs を産生することができる細胞も包含する。本発明は、セ렉チン上に見られる共通の決定基、好ましくはE-セ렉チンおよびL-セ렉チンおよび前記抗体を発現することができる細胞上の共通の決定基に結合することができる mAbs を包含する。本発明は、新規なモノクローナル抗体であるEL-246、および新規なmAbを産生することができる細胞も包含する。モノクローナル抗体EL-246を産生する細胞は、ブダペスト条約により1992年5月22日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC)、12301、パークローン・ドライブ、ロックビル、メリーランド、20852、アメリカ合衆国に受理番号HB11049で寄託した。

本発明は、L-セ렉チンおよびE-セ렉チンのショートコンセンサス反復 (SCR) ドメイン上に存在する1種類以上のエピトープおよびmAbsを産生することができる細胞と結合するモノクローナル抗体およびそれらと機能が同等のものを包含する。

本発明は、これらの抗体、およびFabおよびF(ab')₂フラグメントのような総ての生物学的活性を有するこれらの抗体のフラグメントを包含する。本発明にとって特に興味深いのは、離れている別個の付着分子に結合することができる抗体、好ましくは離れている別個のセ렉チンに結合することができる抗体

最も好ましくはヒトで産生されまたは組換え技術または他の技術により「ヒューマナイズド (humanized)」(すなわち、ヒトでは免疫原性を持たない) E-およびL-セレクトインに結合することができる抗体である。ヒューマナイズド抗体は、例えば抗体の免疫原性部分を、対応はするが免疫原性を持たない部分(すなわち、キメラ抗体)で置換することによって産生させることができる。このようなキメラ抗体は、ある種のものの由来の抗体の反応性または抗原結合性部分および別の品種由来の抗体(免疫原性を持たないもの)のFc部分を含むことができる。キメラ抗体の例としては、非ヒト哺乳類-ヒトキメラ、齧歯類-ヒトキメラ、ネズミ-ヒトおよびラット-ヒトキメラが挙げられるが、これらに限定されるものではない(ロビンソン (Robinson) ら、国際特許出願第184, 187号明細書; タニグチ、エム) (Taniguchi M.)、欧州特許出願第1, 717, 496号明細書; モリソン (Morrison) ら、欧州特許出願第173, 494号明細書、ノイベルガー (Neuberger) ら、PCT出願WO86/01533号明細書; カビリー (Cabilly) ら、欧州特許出願第125, 023号明細書; ベター (Better) ら、1988年Science, 240:1041; リウ (Liu) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3439; ニシムラ (Nishimura)、1987年、Canc. Res., 47:999; ウッド (Wood) ら、1985年、Nature, 314:446; ショウ (Shaw) ら、1988年、J. Natl. Cancer Inst., 80:1553、これらの文献は総て参考として本明細書に引用したものである)。

「ヒューマナイズド (humanized)」キメラ抗体の総説としては、モリソン・エス (Morrison S.)、1985年、Science, 229:1202およびオイ (Oi) ら、1986年、BioTechniques, 4:214がある。

好適な「ヒューマナイズド」抗体は、CDRまたはCEA置換によって産生させることもできる(ジョーンズ (Jones) ら、1986年、Nature, 321:552; ベルヘヤン (Verhoeyan) ら、1989年、Science, 239:1534; バイドラー (Beidler) ら、1989年、J. Immunol., 141:4053、これらの文献は総て参考として本明細書に引用したものである)。本発明はまた、炎症性および免疫反応、ARDS、糸球体腎炎、急性お

よび慢性同

種移植片拒絶反応、炎症性皮膚疾患、リウマチ性関節炎、喘息、アテローム性動脈硬化症、全身性エリテマトーデス、結合組織疾患、静脈炎、虚血-再灌流による損傷、および癌などに関与する疾患の診断、予防および治療にこれらの化合物を用いる方法を提供するが、これらに限定されるものではない。本発明は、白血球-内皮相互作用および疾患の機構における付着分子の役割を検討するための新規な研究手段も提供する。

哺乳類のリンパ球は、イン・ビボで動物を免疫するかまたはイン・ビトロで全細胞、付着分子を発現する細胞または単離された付着分子若しくはそのフラグメントと接触させることにより免疫される。E-セレクトインおよびL-セレクトインを両方とも認識する本発明のモノクローナル抗体は、適当な抗原性刺激または免疫原に応答して生成する。本発明の抗体を産生させるには、セレクトインを発現する天然に存在する細胞の形態の免疫原、L-および/またはE-セレクトインでトランスフェクションしたまたは形質転換した細胞、またはセレクトインタンパク質およびペプチド単独または包合した他のタンパク質、リポソームなど。この免疫原はE-セレクトインおよびL-セレクトインに共通なタンパク質領域を含み、更に好ましくはこの免疫原はSCRドメインまたはそのフラグメントを含む。

一つの態様では、ヒトE-セレクトインcDNAおよびL-セレクトインcDNAを安定に発現する単細胞タイプをE-およびL-セレクトインと反応する抗体を生成する免疫原として用いる。

もう一つの態様では、ヒトL-セレクトインを安定に発現する細胞を免疫原として用いる。本発明のもう一つの態様では、ヒトSCRドメインまたはその部分を安定に発現する細胞を免疫原として用いる。もう一つの態様では、ヒトE-セレクトインcDNAを安定に発現するマウスリンパ球細胞をE-セレクトインおよびL-セレクトインと反応する抗体を生成する免疫原として用いる。もう一つの態様では、サイトカインでの刺激の後にE-セレクトインを発現する内皮細胞またはL-セレクトインを発現する末梢血白血球を免疫原として用いる。

イン・ビボで免疫感作するには、数週間（例えば、2～4時間）までの間隔で

必要なだけ免疫感作を繰り返して、十分な力価の抗体を得るようにする。細胞、細胞抽出物または抗原付着タンパク質、ペプチドまたはフラグメントを、適当な

溶液またはアジュバントに運ぶのである。最後の抗原を増加した後、動物を屠殺して、脾臓細胞を取り出す。

ハイブリドーマの形成およびモノクローナル抗体の産生は、当業界で公知の多数の様々な手法によって行うことができる。基本的には、本発明の方法は、最初にイン・ビボまたはイン・ビトロで抗原または免疫原で予め刺激しておいた哺乳類の脾臓からの免疫細胞などの免疫細胞を得ることからなっている。次に、これらの細胞を、細胞培養において無限に複製し、したがって永久に免疫グロブリンを分泌する細胞系を産生することができるミエローマ細胞または形質転換細胞のような細胞と融合させる。好ましくはネズミであるが、他の哺乳類の細胞から誘導することもでき、ラットおよびヒトを包含するがこれらに限定されない永久細胞またはミエローマ細胞であって、ある種の栄養を利用することが必要な酵素を欠き、速やかに成長することができ、良好な融合能を有する細胞を選択する。多くのこのような細胞系またはミエローマは、当業者に知られており、また他のものは普通に記載されている。酵素の欠失としては、例えばチミジンキナーゼ (TK) またはヒポキサンチン-グアニンホスホリボキシルトランスフェラーゼ (HGPRT) を挙げることができる。これらを欠いていることにより、例えばヒポキサンチンアミノプテリンチミジン培地 (HAT) 上で成長する能力により融合細胞を選択することができる。好ましくは、用いられる永久融合パートナーは、免疫グロブリンを分泌しない細胞系から誘導される。得られる融合細胞またはハイブリドーマを融合細胞は生き続けるが融合しない細胞は生き続けない条件下で培養し、生成するコロニーをスクリーニングして所望なモノクローナル抗体を産生させるのである。このような抗体を産生するコロニーをクローニングし、膨脹させて、イン・ビボまたはイン・ビトロで成長させて、多量の抗体を産生させる (これらの細胞を融合する理論的基礎および実際的方法の説明については、ケーラー (Koehler) およびミルシュタイン (Milstein)、1975年、Nature, 256:495を参照されたい。この文献の開示内容は参考として本明細書

に引用したものである)。これらの方法を以下において更に詳細に説明するが、当業者であれば、これらの手法の改質および付加は本発明の範囲から離反することなく行うことができることを理解されるであろう。

個々の融合細胞は、個々の組織培養ウェルで成長させることができる。放射線を照射した胸腺リンパ球または他の細胞のような支持細胞を用いて、細胞の生存率を増加させることができる。個々のウェルを形成するハイブリドーマ培養上清を分析し、酵素結合イムノアッセイ (E I A) およびイムノドットアッセイなどの当業界で知られている好適な検出法を用いて、ヒト細胞付着分子 c D N A でトランスフェクションした哺乳類細胞または白血球、または精製した付着分子またはそのフラグメントに結合する抗体を得る。前者については、培養上清を、抗体が結合する特異細胞付着分子 (C A M) でコーティングした反応細胞に入れる。インキュベーションの後、反応ウェルを洗浄し、抗原に結合した残っている抗体を、抗-C A M抗体と反応する標識抗体によって検出する。好適な標識には、放射性同位元素、蛍光剤のような発光基質および酵素標識の成分が挙げられる。

イムノドット法を用いて、抗-C A M抗体を発現するクローニングをスクリーニングすることもできる (トゥビン (Towbin) ら、1984年、Immunol . Method, 72:313、この文献の開示内容は参考として本明細書に引用した)。精製したC A Mを硝酸セルロース膜に「ドット」として適用して乾燥させる。非特異的結合部位をゼラチン溶液でブロックした後、膜を培養液上清、抗マウス免疫グロブリン-ペルオキシダーゼ包合溶液および4-クロロ-1-ナフトール溶液に順次浸漬し、浸漬の間にリン酸緩衝塩溶液 (P B S) で洗浄する。反応性免疫グロブリンを発現するクローンが、着色ドットとして現れる。当業界で知られている他のスクリーニング法を用いることもできる。

分泌ハイブリドーマからの多量のモノクローナル抗体は、マウスの腹腔内にクローンを注射し、そこから腹水を回収することによって産生させることができる。好ましくはプリスチンまたは他の腫瘍プロモーターを与えて、化学的または放射線照射によって免疫を抑制したマウスは、様々な株のものでよく、好ましくはニュージーランド・ブラックまたはB a l b / c 株である。腹水をマウスから採

取し、モノクローナル抗体を例えばCMセファロースカラムまたは他のクロマトグラフィ法により精製する。高力価の抗体をこのようにして回収することができる。あるいは、ハイブリドーマを回分または連続培養法でイン・ビトロまたは懸濁培養物として培養し、モノクローナル抗体を培地または上清から回収することもできる。

抗体または抗原に結合するフラグメントを、遺伝子工学によって產生させることもできる。この手法では、標準的なハイブリドーマ法の場合と同様に、抗体產生細胞を所望な抗原または免疫原に対して感作する。免疫脾臓細胞またはハイブリドーマから単離されたメッセンジャーRNAを鋳型として用いて、PCR増幅を利用してcDNAを作成する。バクテリオファージのライブラリーであって、それぞれ初期の抗原の特異性を保持している1本の重鎖遺伝子と1本の軽鎖遺伝子とを含むものをcDNAを用いて產生させる。組合せライブラリーは、重鎖遺伝子ライブラリーを軽鎖遺伝子ライブラリーと結合することによって構築される。これにより重鎖と軽鎖を同時に発現するクローンのライブラリー（Fabフラグメントまたは抗体分子の抗原に結合するフラグメントに似ている）が得られる。これらの遺伝子を運ぶファージを、細菌にトランスフェクションする。抗体遺伝子合成をトランスフェクションした細胞で誘発させると、重鎖および軽鎖タンパク質は自己集合して、抗原または免疫原でスクリーニングすることによって検出することができる活性な抗体を產生する。

E.coliで重鎖および軽鎖を両方とも発現する技術は、PCT特許出願明細書、公開番号WO901443、WO901443およびWO9014424、およびヒュース (Huse) ら、1989年、Science, 246:1275~1281の主題であり、これらの文献は参考として本明細書に引用した。

E-セレクトインおよびL-セレクトインを認識しまたはこれらと結合することの他に、本発明のモノクローナル抗体はこれらの分子の付着機能をブロックする。一つの態様では、本発明は、ヒトE-およびL-セレクトインで発現する共通のエピトープを認識する新規なmAB (EL-246) である。EL-246は両タ

ンパク質の機能をブロックし、様々な異なる動物由来のセレクトインを認識し、そのエピトープはEーおよびLーセレクトインのSCRドメイン内にあるか、またはSCRドメインを必要とする。このSCRドメインと反応する本発明の新規な抗体は、これら2種類の異なるセレクトインの付着機能を抑制する。

末梢リンパ説HEV (Eーセレクトイン依存性) に対するリンパ球付着 (Lーセレクトイン依存性) は、EL-246で>95%までブロックされた。この抑制は、

Lーセレクトインとだけ反応して、Eーセレクトインとは反応しない抗体であるDREG56抗-LーセレクトインブロッキングmAbの抑制(88%)よりも大きい(キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 87:2244-2248)。Lーセレクトインの炭水化物 (PPME) 結合活性はEL-246によって余り抑制されず、EL-246はSCRドメインに特異的であることを示していた。EL-246は付着性Lー細胞で発現されるEーセレクトインの容量は効果的にブロックし(>90%)、ヒト好中球に結合する。

本発明は、心筋梗塞、抗原によって刺激される喘息性反応またはショックなどの急性環境、または同種移植片の拒絶反応のような亜急性環境で、治療薬として特に有用であることがある。このmAbは、リウマチ性関節炎のような慢性疾患の治療に有効であることもできる。

本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、哺乳類における喘息の予防または治療の有用な方法である。抗-Lーセレクトイン抗体を用いる喘息の予防または治療法は、1991年7月31日出願の米国特許出願連続番号738,633号明細書およびグンデル (Gundel) ら、1991年、J. Clin. Invest., 88:1407-1411に詳細に記載されており、これらの文献は参考として本明細書に引用したものである。これらの抗体または抗原結合性フラグメントは、抗原によって誘発される喘息性反応を伴うことがある後期気道障害を抑制する。付着分子、Eーセレクトインは、この相の反応を媒介する。本発明によるこの相のブロックは、肺気道の障害を予防するための治療法として働く。抗体または

抗原に結合するフラグメントを、抗原に暴露する前または暴露中にボーラス静脈注射によって1 pg/kg～10 mg/kg体重の治療投与量で投与する。

多くの病原体または病気を引き起こす微生物は、哺乳類細胞に付着する手段として細胞表面付着分子を用いる。本発明の抗体または抗原に結合するフラグメントおよびそれらと生物学的に同等のものは、病原体の哺乳類細胞への付着分子によって媒介される結合をブロックまたは抑制するのに効果的であることがある。更に、本発明の抗体、抗原と結合するフラグメントおよびそれらと生物学的に同等のものは、病原体の哺乳類細胞へのE-およびL-セレクチンによって媒介さ

れる結合をブロックまたは抑制するのに効果的であることがある。このような病気を引き起こす微生物には、ウイルス、寄生中、細菌および真菌性病原体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明のモノクローナル抗体は、セレクチンの多様な機能活性の決定における検討または研究手段として有用である。

E-およびL-セレクチンの多様な機能活性およびこれらのタンパク質の潜在的な「ホモタイプ」の相互作用は、EL-246 エピトープを更に分析することによって理解することができる。サイトカインで活性化された内皮細胞への好中球の付着は、抗-E-セレクチン並びに抗-L-セレクチンによってブロックすることができる (ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:9239-9241; ベビラッカ (Bevilacqua) ら、1989年、Science, (Wash. D. C.) 243:1160-1112; ホールマン (Hallman) ら、1991年、Biochem. Biophys. Res. Comm., 174:236-243; スミス (Smith) ら、1991年、J. Clin. Invest., 87:609-618; スペルチニ (Spertini) ら、1991年、J. Immunol., 147:2565-2573)。キシモト (Kishimoto) ら (1990年、Blood, 78:805-811) は、ある種の抗-E-およびL-セレクチン mAbs は好中球で活性化した内皮細胞の付着に対するそれらのブロック効果において加算的ではなく、これら2種類のタンパク質は同じ付着経路においてレセプター逆レセプ

ター対として関与していることを示唆している。この仮定は、E-セレクトイン cDNA でトランスフェクションした L-細胞への好中球の結合は白血球の抗-L-セレクトイン mAb 処理によってブロックされるという観察によって支持される (キシモト (Kishimoto) ら、1990 年、Blood, 788:805-811)。ピッカ (Picker) ら (1991 年、Cell, 66:921-933) は、好中球上の L-セレクトインが sLex 炭水化物によって修飾され、E-セレクトインに対してこれらの構造を優先的に有することを示すことによってこれらの知見を拡張した。対照的に、スペルチニ (Spertini) ら (1991 年、J. Immunol., 147:2565-2573) は、好中球によって活性

化された内皮細胞付着は E-および L-セレクトインを伴うことも示したが、これらのタンパク質に対する mAbs は加算的ブロッキング効果を有し、別の付着経路を示唆していることを見出した。EL-246 は E-および L-セレクトインの効果的なブロッカーであり、前記の検討において用いたブロッキング mAbs とは異なる分子領域 (下記参照) を認識するので、これは別の報告における不一致のいくつかについての基礎を決定するのに有用であることがある。

L-セレクトイン/P-セレクトインキメラタンパク質を用いるドメインマッピングの検討により、L-セレクトインの SCR ドメインに対する EL-246 エピトープが局在化された。EL-246 によって認識された E-セレクトイン上のエピトープは、このセレクトインの SCR ドメイン内に存在することもできる。SCR における EL-246 エピトープの位置は、EL-246 の炭水化物 PPM E 結合をブロックすることが不可能であることと一致し、且つ L-および E-セレクトインの SCR ドメインが最適付着機能に本質的であることを示している最近の報告と一致している (ワトソン (Watson) ら、1991 年、J. Cell. Biol., 115:235-243; ピゴット (Pigott) ら、1991 年、J. Immunol., 147:130)。背景の説明で述べたように、セレクトインのレクチンドメインが機能には必要であり、多くのブロッキング抗-セレクトイン mAbs はこの領域によってコードされたエピトープを認識する (ボウエン (Bowen) ら、1990 年、J. Cell. Biol., 110:147-153; カン

サス (Kansas) ら、1991年、Cell. Biol., 114:351-358; キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244-2248)。EGFドメインで局在化されたエピトープに対するMAbは、L-セレクトインによって媒介される付着を抑制することを示している (ポーレイ (Polley) ら、1991年、Natl. Acad. Sci. USA, 88:6224-6228; ボウエン (Bowen) ら、1990年、J. Cell. Biol., 110:147-153; カンサス (Kansas) ら、1991年、Cell. Biol., 114:351-358; シーゲルマン (Siegelman) ら、1990年、Cell., 61:611)。ここに示されたデータはこれらの観察を拡大するものであり、セレクトインのそれぞれの細胞外ド

メイン内の適当なエピトープに対するmAbsが付着機能を抑制することができることを説明している。

理論によって拘束されるものではないが、mAbsはリガンド結合による直接的干渉の結果として付着を抑制し、またはmAbの結合、特にレクチンドメインの外側のエピトープを画定するmAbsはタンパク質のコンホメーションに摂動を与え、レクチンドメインの機能的な一体性を間接的に損なうことになることが可能である。EL-246がセレクトインの機能的コンホメーションを変更することによって付着をブロックすれば、これは付着におけるSCRの役割はE-およびL-セレクトインに対するものと同じであることを示唆することになる。これは、SCRの役割がそれぞれのセレクトインについて特異的であると予言したワトソン (Watson) ら (1991年、J. Cell. Biol., 115:234-243) と対照的なものである。EL-246はE-およびL-セレクトインのみを認識するので、この後者の予言はP-セレクトインについては真実である可能性がある。従って、多数のSCRドメイン (それぞれ、E-およびL-セレクトインにおいて9対6および2) を有することに加えて、トロンビンによって活性化される血小板の付着のようなこの分子の特異的機能に寄与するP-セレクトインSCRには分子の差があることがある。

EL-246によって認識されたエピトープについて更に分子および機能の特徴を決定することにより、セレクチンの機能およびこの群の付着タンパク質の進化論的保存が理解される。処理の標的を設計して、EL-246によって認識されるエピトープを制御またはブロックし、これによりイン・ビボでのセレクチンの活性を制御することができる。重要なことは、この部位を抑制する新規な治療薬は、白血球および内皮細胞付着タンパク質を同時に抑制することにより白血球-内皮細胞の付着の活性をブロックするというもう一つの利点を有することである。

このようにして産生されるモノクローナル抗体は、多数の診断および治療用途を有する。これらは、イン・ビトロでは診断薬に用いて、不溶性の形態で存在しまたは生物学的資料または組織または他のヒトに由来する物質を標準的なイムノアッセイプロトコールに付すことによって哺乳類の細胞と会合している付着分子、

好ましくはセレクチンの存在について試験することができる。これらの抗体または抗原に結合するフラグメントは、高内皮性後毛細管小静脈、肺組織または任意の炎症部位のような組織生検材料の分析に用いて、反応性エピトープを有する細胞の存在を検出することもできる。このようなアッセイとしては、ラジオイムノアッセイ、EIA、蛍光または化学発光の形式などを挙げることができる。一つのこのようなアッセイでは、生物学的試料を、本発明の抗体および抗体が結合しているセレクチンの存在を検出するのに用いられる標識した第二の抗体に接触させる。更に、多くの組織化学的方法を用いることができ、当業界で公知である。

一つの特定のアッセイは、当業界で知られている標準的手法ではモノクローナル抗体EL-246を用いて、参考として本明細書に引用した「免疫診断の方法 (Methods in Immunodiagnosis)」、第2版、ローズ (Rose) およびビガッツィ (Bigazzi) 監修、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ (John Wiley and Sons)、1980年、およびキャンベル (Cambell) ら、「免疫学の方法 (Methods of Immunology)」、ダブリュ・エイ・ベンジャミン、インコーポレーテド (W.A. Benjamin, Inc.)、1964年に記載の酵素結合イムノアッセイを行うのである。このようなアッセイは例えば、直接的形式 (標識した第一の抗体が抗原と反応す

る)、間接的形式(標識した第二の抗体が第一の抗体と反応する)、競合形式(標識した抗原の添加)またはサンドイッチ形式(標識した抗体および未標識の抗体を両方とも用いる)並びに当業界に記載の他の形式であることができる。

一つの態様では、哺乳類からの生物学的試料を不溶性マトリックスまたは固形基質に適用して、このマトリックスにセレクトインを有する細胞上のセレクトインを結合させる。このマトリックスをリン酸緩衝塩溶液(PBS)のような生理緩衝液を用いて洗浄して、未結合材料を除く。固形の抗原に結合したマトリックスを、モノクローナル抗体EL-246のような本発明の抗体を含む溶液に暴露する。この抗体を固形マトリックス上の抗原と反応させて、マトリックスを再度洗浄して、未結合抗体を除く。次に、この複合体を第一の抗体と反応するヤギ抗マウスIgGのような標識した第二の抗体を含む溶液に暴露させる。この抗体は、好ましくはペルオキシダーゼのような酵素反応の1成分、 ^{125}I のような放射性同位元素、または化学発光または蛍光基質で標識する。この複合体を再度洗浄して、

未結合抗体を除く。反応は、シンチレーションカウンターまたは分光光度計のような選択した標識にとって適当な手段によって監視する。このような検出法に適する生物学的試料としては、組織生検抽出物、全血、血漿、結成、脳脊髄液、滑液、複数液、尿などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

もう一つの態様では、本発明の抗体を不溶性マトリックスまたは固形基質に適用して、これらの抗体をマトリックスに結合させる。L-および/またはE-セレクトインを含むものと思われる生物学的試料またはその細胞溶解物をマトリックスに加え、マトリックス上の抗体と反応させて、セレクトイン-抗体複合体を形成させる。複合体は、標識した第二の抗体を用いて検出される。標識した第二の抗体はEL-246または生物学的に同等な抗体である。この方法により、L-およびE-セレクトイン、および生物学的試料に含まれているときにはL-およびE-セレクトインを有する細胞を検出する。このアッセイは定性的または定量的である。このアッセイを修飾して、目的とする個々のセレクトインに特異的なモノクローナル抗体を用いることによってL-セレクトインおよびE-セレクトインを識別す

ることができる。このようなモノクローナル抗体は、キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Sci. 87:2244-2248に記載のようなDREG mAbsである。

生物学的試料中のL-および/またはE-セレクトインを有する細胞を検出し、定量する方法は、炎症性疾患、自己免疫疾患、癌、喘息、虚血-再灌流損傷などの疾患状態を診断する上で特に有用である。これらの方法は、これらの疾患状態の進行状況を監視するのにも有用である。更に、この方法は、抗炎症剤、化学療法剤、付着防止剤などの治療薬の治療経過中の効力を監視するのにも有用である。

これらのすべての治療、予防および診断に使用するため、モノクローナル抗体および他の必要な試薬および適当な装置および備品をキットの形態で提供し、容易に入手でき、容易に使用されるようにすることができる。

本発明抗体は、哺乳類で治療、診断などの用途に用いられる医薬製剤に処方することができる。本発明の抗体または高原に結合するフラグメントは、冠状動脈疾患または高血圧、糖尿病、高コレステロールまたは喫煙に伴う心臓発作または卒中の高度の危険性を有する種類の疾患を有する哺乳類の予防および/または治

療に特に有用である。

本発明の抗体または抗原に結合するフラグメントは、外科手術中または後、特に冠状動脈バイパス手術後に起こる虚血-再灌流による損傷の防止または治療にも有用である。

これらの抗体、抗原と結合するフラグメントおよびそれらと機能的に同等のものは、肺の虚血/再灌流による損傷の防止または抑制に特に有用である。本発明は、肺機能の喪失を予防または抑制し且つE-セレクトインおよびL-セレクトインに結合することができる抗体で処理した哺乳類の死亡を防止する効果的な治療薬であることが示されている。

肺移植の場合などの肺虚血/再灌流による損傷の治療を必要とする哺乳類は、肺機能の喪失を防止しまたは抑制し且つ死亡を防止するのに効果的な量の抗体またはそれと機能が同等のものを投与される。このような哺乳類の治療により、罹

患部位での炎症反応を防止し、抑制または減少させる。

本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントは、アレルギー性鼻炎、喘息およびアナフィラキシーの予防または治療にも有用である。本発明の抗体は、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、若年型糖尿病、シェーグレン症候群、結合組織疾患などの炎症性疾患および自己免疫疾患の予防または治療にも有用である。

本発明の抗体、抗原と結合するフラグメントおよびそれらと機能的に同等のものは、E-セレクトインおよび/またはL-セレクトインによって媒介される細胞-細胞相互作用を防止または抑制するのに有効である。これらの抗体は、活性化した内皮細胞層を含むE-セレクトインを発現する細胞、E-セレクトイン cDNA トランスフェクタントなどと好中球のL-セレクトインとの相互作用を抑制する。本発明の抗体は、動脈、静脈、毛細管、リンパ管などの存在する内皮細胞層状のE-セレクトインにより媒介される好中球のローリングを防止または抑制する。これらの抗体およびそれらと機能的に同等なものによって産生される抑制効果は、炎症反応を防止し、抑制または調節するのに有用である。

本発明の抗体またはそれらと機能的に同等なものは、末梢リンパ節に含まれる高内皮性後毛細管小静脈細胞 (HEV) へのE-セレクトインを発現する細胞の結合を防止または抑制することができる。

異種移植片のイン・ビボでのホーミング (homing) モデルを用いると、ヒト、ヤギ、ヒツジおよびウシ由来のリンパ球は、静脈内注射の後には組織特異的にマウスのリンパ球組織へと戻ることを見出した。これらの結果は、初期の観察からホーミング機構は哺乳類間で高度に保存されることが判っているので驚くべきことではない (スペルチニ・オー (Spertini, O.) ら、1991年、J. Immunol., 147:942; ヴウ、エヌ・ダブリュ (Wu, N.W.) ら、1988年、J. Cell Biol., 107:1845; ウォルチェック、ビー (Walcheck, B.) ら、1992年、Eur. J. Immunol., 22:469)。

本発明の一つの態様は、哺乳類におけるリンパ組織へのリンパ球のホーミングを防止または抑制する方法である。本発明の抗体は、リンパ球がリンパ組織へ戻

る能力を抑制する。

白血球は、E-セレクトインを特異的に発現する部位へEL-246を運ぶことができる。好中球をEL-246でプレコーティングし、洗浄し、E-セレクトインcDNAトランスフェクタントまたはサイトカインで活性化したHUVECsへ加えたアッセイでは、mAbは白血球からE-セレクトインへ移った。FITC-抗-マウス第二段階で染色し、白血球から移行した後にフローサイトメトリーによって測定したところ、E-セレクトイントランスフェクタント上のEL-246の量は、飽和量のEL-246でトランスフェクタントを直接染色した後の量より大きかった。表面L-セレクトインに結合したEL-246のシェディング (shedding) はこれらの結果と合わなかったが、これはEL-246を喪失した好中球が抗-L-セレクトインmAbDREG56で明瞭に染色されるためである。DREG56はアッセイの経過中に細胞表面にトランスロケーションした新たなL-セレクトインと反応したとは思われず、これは(1)アッセイ時間が比較的短く(15分間)、(2)以前に形成されたL-セレクトインの有意な細胞内プールが好中球の以前の分析では検出されなかったためである (ジュティラ (Jutila, M.A.) ら、1989年、J. Immunol., 143:3318; キシモト、ティーケイ (Kishimoto, TK) ら、1990年、Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 87:2244; ジュティラ (Jutila, M.A.) ら、1990年、Cell. Immunol., 132:201; キシモト、ティーケイ (Kishimoto, TK) ら、1989年、Science, 245:1238)。好中球がイン・ビトロでL-セレクトインを喪失してしまうと、それらは新たな発現がみられる前に死滅するのが普通である。EL-246がL-セレクトインからE-セレクトインへ移行し、これらの分子が緊密に会合すると、白血球はイン・ビボでmAbに対する効果的な伝達系となることができる。

本発明の抗体および抗原と結合するフラグメントは、病原体または潜在的に病原性を有する微生物によって引き起こされる感染症および疾患の予防および治療に有用である。抗体、これらの抗体の抗原と結合するフラグメント、またはそれらと生物学的に同等なものを含んでなる医薬組成物を、付着分子を有する宿主哺

乳類細胞、好ましくはセレクチン、最も好ましくはL-またはE-セレクチンに投与する。

患者に、受容哺乳類、好ましくはヒトに対する本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントを供給する場合に、投与される抗体または抗原に結合するフラグメントの投与量は、哺乳類の年齢、体重、身長、性別、総合的医学的条件、病歴などによって著しく変化する。通常は、受容哺乳類には（哺乳類の体重の）約 $1 \text{ pg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ の範囲の抗体または抗原に結合するフラグメントの投与量を供給することが望ましいが、これより多量または少量を投与することもできる。前記の抗体または抗原と結合するフラグメントの組合せを用いることによって、治療有効量を低くすることができる。本明細書で用いられるように、一方の化合物を、第二の化合物と共に更に投与し、これら2種類の化合物は、両化合物が同時に患者血清中に検出することができるような時間内に投与するのである。

本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントは、これを受容する被験者に、炎症症状の重さ、程度または期間を少なくしまたは減少させるのに十分な量で供給されることを意図したものである。

本発明の抗体またはそれらのフラグメントは単独で投与することができ、または1種類以上の追加の抗炎症薬または抗喘息薬（例えば、カテコールアミン、レゾルシノール、サリゲニンおよびエフェドリン）、糖質コルチコイド（例えば、ヒドロコルチゾン）、染色体（例えば、クロモリンナトリウム）および抗コリン作動薬（例えば、アトロピン）と組合せて投与し、炎症または喘息症状を治療するのに要するこれらの薬剤の量を減少させることができる。

本発明の薬剤は、「予防」または「治療」の目的で投与することができる。予防的に投与するときには、これらの薬剤は症状が起こる前に投与される。これらの薬剤を予防的に投与することにより、引き続いて起こる炎症反応を防止しまたは弱めることができる。治療目的で投与するときには、これらの薬剤を炎症症状の開始時（または直後）に投与する。これらの薬剤を治療的に投与することにより、実際の炎症症状を弱めることができる。従って、本発明の薬剤は、予想され

る炎症症状の開始前に投与し（予想される症状の重さを軽減し、症状の期間または範囲を短縮する）、または症状が見られた後に投与することもできる。

これらの抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経口、経鼻などの治療条件に適する経路によって投与することができる。抗体は、治療する哺乳類の血流中に注射するのが好ましい。当業者であれば、好ましい経路は治療を行う条件と共に変化することを容易に理解されるであろう。

抗体は純粋なまたは実質的に純粋な形態で投与することが可能であるが、医薬処方または製剤として存在することが好ましい。

本発明の処方は、獣医用でもヒト用でも、前記の抗体を1種類以上の製薬上許可能なキャリアーおよび場合によっては他の治療成分と共に含む。（複数の）キャリアーは、処方の他の成分と相溶性であり且つそれを受容するものにとって有害ではないという意味において「許容可能」でなければならない。これらの処方、単位投与形態で提供されるのが好都合であり、製薬業界に公知の任意の方法によって製造することができる。

総ての方法は、活性成分を1種類以上の補助成分から成るキャリアーと会合させる段階を含んでいる。通常は、活性成分を液体キャリアーまたは微細に分割された固形キャリアーまたは両方と均一且つ緊密に会合させた後、必要に応じて生成物を所望な処方に成形することによって、処方を得ることができる。

静脈内、皮下または腹腔内投与に好適な処方、活性成分と好ましくは受容するものの血液と等張の溶液との無菌水溶液から成るのが好都合である。このような処方、固形活性成分を、塩化ナトリウム（例えば、0.1～2.0M）、グリシンなどの生理学的に適合する物質を含み、水溶液を生成するのに生理条件で適合する緩衝pHを有する水に溶解し、この溶液を殺菌することによって好都合に調整することができる。これらは、単位または複数投与容器、例えば密封アンブルまたはバイアルに入れて提供することができる。

本発明の処方、安定剤を配合することができる。安定剤の例としては、ポリエチレングリコール、タンパク質、糖、アミノ酸、無機酸、および有機酸であって、それら自体でもまたは混合物としても用いることができるものがある。これ

らの安定剤は、抗体1重量部当たり0.11~10,000重量部の量で配合するのが好ましい。2種類以上の安定剤を用いる場合には、それらの総量が前記の範囲内になるのが好ましい。これらの安定剤は適当な濃度およびpHで水溶液で用いられる。このような水溶液の比浸透圧は0.1~3.0オスモルの範囲内にあるのが普通であり、好ましくは0.8~1.2の範囲にある。水溶液のpHは5.0~9.0の範囲内に調整され、好ましくは6~8の範囲内に調整される。本発明の治療薬の処方では、付着防止剤を用いることができる。

もう一つの製薬法を用いて作用の期間を調節することができる。徐放性製剤は、ポリマーを用いて、本発明の抗体、抗原に結合するフラグメントまたはそれらの機能的誘導体を複合体形成させまたは吸収させることによって得ることができる。徐放は、適当な高分子（例えば、ポリエステル、ポリアミン酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはプロタミン、硫酸塩）、および高分子の濃度並びに徐放を行うための配合法を選択することによって行うことができる。徐放性製剤によって作用期間を制御するためのもう一つの可能な方法は、抗体、抗原と結合するフラグメントまたはそれらの機能的誘導体を、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）またはエチレン-酢酸ビニルコポリマーなどのポリマー材料の粒子中に配合することである。あるいは、これらの薬剤をポリマー性粒子中に配合する代わりに、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルなどのコアセ

ルベーション手法または界面重合によって、またはコロイド状薬剤伝達系、例えば、リポソーム、アルブミン微小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル、またはマクロエマルジョン中で、調整したマイクロカプセルにこれらの材料を取り込むことが可能である。このような手法は、レミントンズ・ファーマス्यूティカル・サイエンス（Remington's Pharmaceutical Science）（1980年）に開示されている。

経口製剤が所望なときには、組成物を特にラクトース、スクロース、澱粉、タ

ルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶性セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウムまたはアラビアゴムなどの典型的なキャリアーと組合せることができる。

実施例 1

ハイブリドーマの産生および抗体の特性決定法

免疫感作およびモノクローナル抗体の生成

ヒトE-セレクトインcDNAを安定に発現するマウスL1-2リンパ腫細胞(L1-2ELAM) (ピッカー (Picker) ら、1991年、Cell, 66: 921-933、参考として本明細書に引用した) を、本発明の抗体を生成するための免疫原として用いた。簡単に説明すれば、L1-2ELAM細胞(2×10^7) を、アジュバントの非存在下で2週間の間隔でC57BL/6マウスに腹腔内投与した(全部で3回投与)。最後の投与は融合の4日前に行った。SP2/0ミエローマ細胞系を融合パートナーとして用い、前記の手続きを行ってハイブリドーマを生成させた(キシモト (Kishimoto) ら、1990年Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 244-248、参考として本明細書に引用)。SP2/0-Ag14ミエローマ細胞系をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、12301パークローン・ドライブ、ロックビル、メリーランド、20852、アメリカ合衆国から寄託番号1581のものを入手する。融合物を10日目に、E-セレクトインをトランスフェクションし、モック・トランスフェクションした(mock transfected) L1-2細胞を用いてフローサイトメトリーによってスクリーニングした。総数で279個

のウェルをスクリーニング化、15個を選択して更に分析を行った。第二のスクリーニングは、SDS-PAGE/ウェスタンブロット分析、免疫組織学、および末梢血白血球の染色を含んでいた。以下に説明するように、マウス IgG1であるEL-246は、E-セレクトイントランスフェクタントとヒト白血球の両方を染色することが判った。

動物

血液供給源として用いた動物は、モンタナ州立大学の大型動物施設から無作為

に選択した。B a l b / C および C 5 7 B L / 6 マウスの両株を用いた。マウスは週齢を6～12週とし、主としてモノクローナル抗体の生成またはリンパ様組織源として用いた。マウスを、A A A L A C が認定したモンタナ州立大学の小型動物施設に収容した。M S U 大型動物施設に収容された生後1か月の子牛を、幾つかの実験での末梢血源として用いた。

利用したモノクローナル抗体

ヒトL-セレクトリンを認識することが示されている (カメリニ (Camerini) ら、1989年、Nature (London), 342:78-80; キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244-2248、参考として本明細書に引用) マウス IgGs であるLeu-8 (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー (Becton Dickinson & Co.)、マウンティンビュー (Mountainview)、カリフォルニアより購入) mAbのDREG系列 (DREG56、DREG200) およびDREG152) を、下記のフローサイトメトリーおよびウェスタンブロット分析で用いた。Leu-8をフィコエリスリン (PE) 包合体として用い、DREGmAbは未包合mAbの後に適当な第二段階を行ったものとしてまたは蛍光イソチオシアネート (FITC) 包合体として用いた。DREGmAbsは、硫酸アンモニウム沈殿により部分的に精製した。他のmAbsであるDREG55 (マウス抗-L-セレクトリンIgG1)、SH43 (マウスIgG1抗-ヒト血小板、ジュティナ、エム・エイ (Jutina, M.A.)、未公表) およびEL-81 (マウスIgG1抗-ELAM-1) を、下記の実験の多くにおけるネガティブコントロールとして用いた。

フローサイトメトリー分析は、FACScan[®]上で (ベクトン・ディッキンソン、マウンティンビュー、カリフォルニア) 文献記載の方法で行った (ジュティナ (Jutina) ら、1989年、Immunol., 143:3318-3324; キシモト (Kishimoto) ら、1989年、Science (Washington, D. C.) 245:1238-1241; ジュティナ (Jutina) ら、1990年、Cell. Immunol., 132:201-214、参考として本明

細書に引用)。フローサイトメトリー分析はE-またはL-セレクチンを発現する細胞の蛍光およびEL-246で処理した後E-またはL-セレクチンを発現しない細胞のネガティブ蛍光によって示されるE-セレクチンおよびL-セレクチンについてのEL-246モノクローナル抗体の特異性を証明するために行った。2種類のカラー分析について、PE-包含したLeu-8(ペクトン・ディッキンソン)またはFITC包含したDREG MabをEL-246と組合せて用いた。第二段階で染色した細胞を10%マウス結成で処理し、利用可能な抗マウスIg結合部位をブロックし、ネガティブコントロールマウスmAbsを用いてバックグラウンド染色のレベルを評価した。データーは10,000~50,000個の細胞から集め、棒グラフまたは輪郭プロットとして表した。

ウェスタンブロットSDS-PAGE分析

ウェスタンブロット分析を行った、E-セレクチンまたはL-セレクチンあるいは免疫アフィニティーによって精製したE-セレクチンまたはL-セレクチンを発現する細胞からの細胞溶解物を用いてE-セレクチンおよびL-セレクチンに対するEL-246モノクローナル抗体の特異性を証明した。E-セレクチンおよびL-セレクチンについての適当な分子量に対応するタンパク質バンドのEL-246抗体による陽性染色が見られたことから、両セレクチンに対して特異的であることを示していた。

ヒト末梢血リンパ球の溶解物またはL1-2ELAM細胞懸濁液を、 3×10^7 個の細胞をNP-040リーシス緩衝液(3%NP-40、150mM NaCl、1mM $MgCl_2$ 、5mM EDTA、0.02% NaN_3 、およびプロテアーゼインヒビターであるペプスタチンA、アンチパイン、ロイペプチン、キモスタチン、ベンズアミジン、およびPMSFを $10 \mu g/ml$ 、総て

は50mMトリス-HCl、pH7.5中)1.0ml中で氷上で30分間インキュベーションすることによって調整した。溶解物を10,000gで10分間遠心分離することによって透明にし、アフィニティー精製に用いるか、または直接SDS/PAGE-ウェスタンブロット分析に用いた。

アフィニティーにより単離するには、ポリ分離用クロマトグラフィカラム(バ

イオーラッド・ラボラトリーズ (Bio-Rad Laboratories)、リッチモンド、カリフォルニア) を用いて製造業者指示に従って (フォルマシア・ファイン・ケミカルズ (Pharmacia Fine Chemicals)) 適当な mAb (ビーズ 1 ml 当たり mAb 4 mg) にカップリングした。

目的とする抗原を含む溶解物 1 ml を洗浄緩衝液 (150 mM NaCl、1 mM MgCl₂、0.1% NP40、5 mM NaN₃、20 mM トリス緩衝液、pH 7.5) と混合し、ローテーター上で前記のビーズと 4℃ で 2 時間組合せた。インキュベーションの後、ビーズを洗浄緩衝液 10 ml で洗浄して、未結合抗原を除いた。結合した抗原を溶出緩衝液 (500 mM NaCl、0.1% NP40、5 mM NaN₃、200 mM 酢酸) 3 ml で溶解し、溶出液を 0.5 ml ずつ回収し、1 M トリス緩衝液、pH 8.0 100 μl で中和した。目的とするタンパク質を含む画分を、ドット・プロット分析によって測定した。

SDS/PAGE-ウェスタンブロット分析のため、粗製溶解物またはアフィニティーによって精製した抗原を等容の非還元性 SDS-可溶化緩衝液 (2×) と混合して 8% SDS/PAGE ゲル上で行い、製造業者の指示により Bio-Rad トランスブロット装置でニトロセルロースへ移した (バイオ・ラッド・ラボラトリーズ)。温和な末変性条件を用いた (沸騰は行わず、ほとんどの処置は 4℃ で行った)。フィルターを、トリス・バランスド・ソルト・ツィーン TBS-T (10 mM トリス-HCl、pH 7.4、150 mM NaCl および 0.05% ツィーン 20) 中 50% ウマ結成を用いて 30 分間インキュベーションした。25 レーンのミニブロット装置 (イムノネティックス (Immunonetics)、ケンブリッジ、マサチューセッツ) を用いて、次にフィルターを 50 μg/ml の濃度または培養上清液としての特異的またはネガティブコントロールマウス mAb と共に 30 分間インキュベーションした。次に、ニトロ

セルロースフィルター TBS-T で洗浄し、ヤギ抗-マウス Ig-アルカリホスファターゼ包合体 (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Company)、A-9654) と共にインキュベーションし、1:200 に希釈した後、再度洗浄した。ブロットは、基質溶液 (プロメガ・バイオテック (Promega Biotech)、

マジソン、ウィスコンシン)を添加することによって展開した。

白血球細胞懸濁液

白血球を、ヒト、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ブタ、ラットおよびニワトリの末梢血から採取した。通常の免疫蛍光染色のため、RBCs (ニワトリRBCsを除く)を低張液で溶解した。ヒト血液を白血球源として用いて、下記の機能分析を行った。前記の方法を用いて、単核細胞および好中球を単離した(キシモト(Kishimoto))ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 87:244-248; ジュティナ(Jutina)ら、1989年、Immunol., 143:3318-3324; キシモト(Kishimoto)ら、1989年、Science (Wash. D. C.), 245:1238-1241; ジュティナ(Jutina)ら、1990年、Cell. Immunol., 132:201-214、参考として本明細書に引用)。簡単に説明すれば、血液をクエン酸塩凝固防止剤管に収集し、温和なハックス・バランスド・ソルト・ソリューション(HBSS)で1:2に希釈し、ヒストパック(Histopaque)1077を下層に敷き、2,300rpmで30分間温室で遠心分離した。単核細胞をヒストパック/血漿海綿から回収した。RBCsおよび好中球を含むペレットを最初の容積のHBSSに再懸濁し、好中球をデキストラン沈降によって単離した。単核細胞および好中球製剤中の残部のRBCsを低張処理によって溶解した。

免疫蛍光染色

白血球の免疫蛍光染色は、文献記載の方法によって行った(ジュティラ(Jutila)ら、1989年、Immunol., 143:3318-3324; キシモト(Kishimoto)ら、1989年、Science (Wash. D. C.), 245:1238-1241; ジュティラ(Jutila)ら、1990年、Cell. Immunol., 132:201-214 スタンパー(Stamper)ら、1976年、J. Exp. Med., 144:828)。簡単に説明すれば、 1×10^6

6

個の細胞を、最初に氷上で2%ウサギ血清中で10分間インキュベーションしてFcレセプターをブロックした。細胞を洗浄した後、氷上で第一の抗体50 μ g

／m l（または末希釈培養上清）と共に20分間インキュベーションした。洗浄した後、結合した抗体をDMEM中5%FBSで1:80に希釈したPEまたはFITCと包合したF(ab)'₂ヤギ抗マウスIgと共にインキュベーションすることによって結合した抗体を表した（タゴ・インコーポレーテド（Tago Inc.）、パーリングラム、カリフォルニア）。

免疫ペルオキシターゼ染色

アセトンで固定した6 μ mの凍結した扁桃腺の切片を、加湿した室内で室温にて30分間リン酸緩衝塩溶液（PBS）（50 μ g／m l）中で抗体と共にインキュベーションした後、PBSで洗浄した。TAGO組織化学キット（ヒストプローブ）（Histoprobe）、TAGO、パーリングラム、カリフォルニア）を用いて、アビジン-ビオチン系を用いる3段階免疫ペルオキシターゼ染色を製造業者の指示によって行った。切片は、ヘマトキシリンにより薄く逆染色された。

末梢血白血球のイン・ビトロにおけるPMA処理

前記の動物から単離した末梢血の単核細胞を、ホルポールミリステートアセテート（PMA）（10 ng／m l、シグマ、セントルイス、ミズーリー）と共に37℃でHBSS中で20分間インキュベーションした。インキュベーションの後、細胞を洗浄し、次いで染色を行い、フローサイトメトリー分析を行った。

実施例2

ヒトE-セレクトインのEL-246認識

E-246を、最初にフローサイトメトリーおよびSDS-PAGE／ウェスタンブロットによって、ヒトE-セレクトインcDNAでトランスフェクションしたマウスL1-2細胞上でスクリーニングした。第1図に示されるように、トランスフェクションしたE-セレクトインはフローサイトメトリー分析でEL-246で明るく染色されたが、モックトランスフェクションしたL1-2細胞は染色されず、E-セレクトインに対して抗体が特異的であることを示していた。矢印はヒストグラムを示し、（1）L1-2 ELAMのEL-246染色（2）L1-2トランスフェクタントネガティブコントロール、および（3）L1-2

ELAMトランスフェクタントのバックグラウンド染色（第二段階コントロール

)を表している。EL-246によって認識されたトランスフェクタントによって発現される抗原の分子量は、非還元性SDS-PAGE/ウェスタンブロット下では約110kD(図2)であり、これはE-セ렉チンについての適当な分子量である。L1-2ELAM NP40溶解物は、非還元性8%SDS/PAGE上で実験し、ニトロセルロースに移した。プロットをEL-81(抗-E-セ렉チン、レーン3)、EL-246(レーン2)およびネガティブコントロール抗体(レーン1)でプローブした。分子量マーカーの移動距離は、示した通りである。フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットによって示されるように、EL-246はE-セ렉チンcDNAでトランスフェクションしたL-細胞を認識したが、P-セ렉チンcDNAでトランスフェクションした細胞は認識しなかった。EL-246とE-セ렉チンとの反応性を示す追加的手段として、炎症を起こした扁桃腺の切片を染色して免疫組織学的分析を行った。図3に示されるように、EL-246は炎症を起こしたヒト扁桃腺中で小静脈(E-セ렉チン)を染色した。ヒト扁桃腺の凍結切片を実施例1に記載したのと同様に調製して、EL-246を用いて免疫ペルオキシダーゼによって染色した(倍率400×)。従って、許容可能な性化学的および分子基準を用いると、EL-246はヒトE-セ렉チンを明瞭に認識した。

実施例3

ヒトL-セ렉チンのEL-246認識

フローサイトメトリー分析を行ったところ、EL-246はヒト末梢血白血球も染色することを示していた。白血球表面抗原を、PMAで処理した後、ダウンレギュレーションする。ヒト末梢血白血球を実施例1と同様の方法で単離し、EL-246で染色してフローサイトメトリー分析を行った。明確な前方および側方光散乱像によって同定される好中球およびリンパ球上のEL-246抗原の発現は、代表的なヒストグラムで示される。PMA活性化の前(未処理、図4A)、PMA活性化の20分後(PMA処理、4B図)の染色の比較を示す。イソタイプコントロールまたは第二段階のみのバックグラウンド蛍光は、それぞれの分析において<10のモード蛍光値を示した。総ての循環するヒト好中球はE

EL-246を発現したが、陽性のリンパ球の数は変動し、これはL-セレクトインについて記載したものと同一分布パターンである（キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:244-2248；カンサス (Kansas) ら、1985年、J. Immunol., 134:2995）。2種類のカラーフローサイトメトリーでは、総てのEL-246陽性細胞はDREG56（抗-L-セレクトインmAb（キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:244-2248）陽性であることが示され、2種類の抗体の染色パターンは同様であった（図5）。2種類のカラーフローサイトメトリー染色は、FITC標識したDREG56（抗-L-セレクトインmAb（29）および実施例1に記載したのと同じEL-246を用いて行った。総てのEL-246細胞がL-セレクトインにも陽性であることを示している輪郭プロットが示される。ヒト白血球EL-246抗原はPMAで好中球およびリンパ球を活性化した後は細胞表面から失われ（それぞれ、図4Bおよび4D）、これもL-セレクトインに特徴的なものであった。細胞はヒトL-セレクトインcDNAトランスフェクションしたがトランスフェクタントコントロールではトランスフェクションせず、EL-246で特異的に染色された（下記参照）。最後に、免疫アフィニティーで精製したL-セレクトインはウェスタンブロットでEL-246mAbによって認識されるので、EL-246の反応性タンパク質レベルでも確認した（図6、レーン2）。従って、許容可能な性化学的および分子基準により、EL-246はL-セレクトインとも反応した。

実施例4

EL-246エピトープは多種多様な動物由来のセレクトイン上で発現する

EL-246エピトープの進化論的保存のレベルを評価するため、多種多様な動物由来の末梢血細胞をスクリーニングして、フローサイトメトリーによりEL-246染色を行った。表1に示されるように、EL-246は、ヒト、ヤギ、ヒツジ、ウシおよびブタから単離された白血球を染色した。ニワトリおよびラット白血球は、フローサイトメトリーではEL-246ネガティブであり、このことはサイトスピン製剤が染色されないことによっても確認された。これらの他の

動物でEL-246によって認識された抗原はL-セレクトインの特徴的な分布を有しており、リンパ球はに二相分布を示し、細胞をPMAで処理した血はその表面発現は失われた。

表1

HL-246は多種多様な動物でL-セレクトインを認識する

動物

PBL* 上のL-セレクトインとの反応性

HL-246 mAb

DREG56 mAb

動物	HL-246 mAb	DREG56 mAb
ヒト	+++	+
ヒツジ	+++	-
ヤギ	++	-
ウシ	+++	+
ブタ	++	-
ウマ	-	-
ラット	-	-
ニワトリ	-	-

* PBL=末梢血リンパ球。

実施例5

EL-246はL-セレクトインおよびE-セレクトインの機能をブロックするEL-246のE-およびL-セレクトインの機能をブロックする機能を試験した。L-セレクトインに普遍的に寄与する機能は、末梢リンパ節の高内皮性毛細管小静脈(HEV)細胞へのリンパ球の付着である(ローゼン(Rosen)、1990年、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 3:397-402;ベルグ(Berg)ら、1989年、Immunol. Rev., 108:5-18)。スタンパー-ウッドラフ(Stamper-Woodruff)アッセイは、イン・ビボではリンパ球様器官のリンパ球および内皮の間の付着相互作用の複製物であると当業者によって認められているエックス・ビボアッセイである(ラスキー、エル・エイ(Lasky, L.A.)、1992年、「付着。炎症性疾患における役割(Adhesion.

Its Role In Inflammatory Diseases) 」の第3章、ジェイ・エム・ハールラム (J.M.Harlam) およびディ・リウ (DY Liu) (監修)、ダブリュ・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー、ニューヨーク、p p. 43~63)。この分析法では、各種のリンパ球様器官の凍結切片をリンパ球と共にインキュベーションし、切片を洗浄し、添加したリンパ球とこれらの器官の後毛細管小静脈の特殊化した高壁内皮との間の特異的結合の程度を測定した。

スタンパー・アンド・ウッドラフのエスク・ビボ凍結切片結合アッセイを用いて (スタンパー (Stramper) ら、1976年、J. Exp. Med., 144; 828)、EL-246はリンパ球の末梢リンパ節高内皮性毛細管小静脈への付着も、本発明者らの前記の抗-L-セ렉チンmAb、DREG56と同様にまたはより良好にブロックしたことを見出だした (それぞれ、 $95.6 \pm 4.8\%$ 対 $88 \pm 5.1\%$) (図7)。ヒトリンパ球をEL-246、DREG56またはイソタイプで合わせたネガティブコントロール (EL-81) で水上で20分間処理し、末梢リンパ節HEVへの結合に対する効果を測定した。EL-246を生じる同じ融合物に生成したものを含むコントロールmAbは、リンパ球-HEV結合については効果はなかった。(図7)。EL-246は、FITC-PPMEのヒトリンパ球への結合を余りブロックせず、他の機能はL-セ렉チンによって媒介された (ローゼン (Rosen)、1990年、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 3:397-402)。これらの結果は、L-セ렉チンのEGFドメインに関するmAbのブロッキング活性と同じであった (カンサス (Kansas) ら、1991年、J. Cell. Biol., 114:351-358; シーゲルマン (Siegelman) ら、1989年、Cell, 61:611-622)。

EL-246のE-セ렉チンに対する効果を検討するため、好中球のE-セ렉チンを安定に発現するL-細胞に結合する能力を試験した。この結合分析では、好中球のトランスフェクタントに対する付着は、明らかにE-セ렉チン依存性である (キシモト (Kishimoto) ら、1990年、Blood, 78, 805-811)。トランスフェクタントをEL-246で30分間処理し、洗浄し

た後、精製したヒト好中球を添加した。Fcレセプターを、10%RBSで20分

間好中球を前処理して飽和した後、分析を行った。図7Bに示されるように、EL-246は、好中球のトランスフェクタントへの結合をほぼ完全にブロックしたが(90%)、E-セレクトインを認識するもう一つのmAb(EL-81)(イソタイプネガティブコントロール)は結合に関してはほとんど効果はなかった。同様に、E-セレクトイントランスフェクタントを抗-L-セレクトイン特異的mAb(DREG56)で処理しても、結合に対しては全く効果はなかった(図7)。値はコントロール細胞結合の百分率として記録し、コントロール細胞は分析媒質のみでインキュベーションした。実験を3回繰り返し行い、平均値±s.e.mを示す。従って、EL-246はE-セレクトイン機能の有効なブロッカーである。

好中球-E-セレクトイントランスフェクタント結合分析

キシモト(Kishimoto)ら、1900年、Blood, 78:805-811に記載された安定にヒトE-セレクトインcDNAを発現するL-細胞(フローサイトメトリーにより陽性と測定された80%ELAM-1)を、プラスチック製の8ウェルラブ・テク・スライド(Lab Tek slides)(マイルス・サイエンティフィック)上で成長させた。ヒト末梢血から単離した好中球をcRPMI 1ml当たり 1×10^6 個の細胞で再懸濁させ、400 μ lをトランスフェクションしたL-細胞培養物のウェルに加えた。好中球を、前記の方法(キシモト(Kishimoto)ら、1990年、Blood, 78:805-811)により一定回転条件下で15分間室温で付着させた。インキュベーションの後、それぞれのウェルの媒質を吸引し、スライドチャンバーを除き、スライドをHBSS中に1.0%グルタルアルデヒドを含むコプリン・ジャー(coplin jar)に入れた。好中球/L-細胞の数を計数することによって、付着を測定した。L-細胞のmAb処理の効果は、次のようにして測定した。総ての実験において、好中球を10%ウサギ血清でプレコーティングして、利用可能なFc結合部位をブロックした。E-セレクトイントランスフェクタントをEL-246(培養上清または50 μ g/ml

精製抗体)、DREG 56またはイソタイプのネガティブコントロールmAbで氷上で20分間処理し、洗浄した後、付着分析に用いた。

末梢リンパ節HEV分析

凍結切片でのHEVへ結合するリンパ球のイン・ビトロでのアッセイ(スタンパー(Stamper)ら、1976年、J. Exp. Med., 144:828)は広汎に記載されている(最近では、ベルグ(Berg)ら、1989年、Immunol. Rev., 108:5に総説が記載されている)。マウス末梢リンパ節におけるHEVはヒトリンパ球に良好に結合し、この結合はL-セレクトリンによって変化することが以前に示されている(キシモト(Kishimoto)ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244-2248)。精製したヒトリンパ球をEL-246、ブロッキング用抗-L-セレクトリンmAb(DREG 56)、または様々なイソタイプコントロールと共にインキュベーションし、末梢リンパ節HEVへの付着に対する効果を測定した。細胞結合を、最初にその特徴的な自己蛍光または特異的な群形態学(plump morphology)によってそれぞれの分野におけるHEVを同定した後、文献記載の方法によりHEVI結合した細胞を計数した(キシモト(Kishimoto)ら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244-2248、参考として本明細書に引用)。データーは、個々に記載したHEV当たりに結合した細胞の数として計算した。それぞれのデーターについては、>3の切片での150HEVを計数し、4回の独立な実験を表す。数値は、媒質コントロールの百分率として表す。

実施例6

SCRドメインに対するEL-246エピトープのマッピング

EL-246エピトープのドメインマッピング

EL-246によって画定されたエピトープを、文献記載の方法により、L-セレクトリン/P-セレクトリンキメラを用いて局在化した(カンサス(Kansas)ら、1991年、J. Cell. Biol., 114:351-358、参考として本明細書に引用)。天然のL-セレクトリンを発現する300.19マウスpr

e-B細胞系の安定なトランスフェクタント (アルト (Alt) ら、1981年、Cell, 27-381) であるL2pであって、L-セレクトリン由来のレクチンドメインおよびPセレクトリン由来のタンパク質の残りを含むもの、またはL2P3Lであって、P-セレクトリンのEGFドメインのみがL-セレクトリンの

EGFドメインの代わりに用いられているものを、文献記載の方法によって産生した (カンサス (Kansas) ら、作成中)。それぞれのタイプの 5×10^6 個の細胞を、培養上清または前記mAbの希釈した腹水を含むPBS/1%FCS100 μ l中で氷上で15分間インキュベーションし、洗浄して、FITCと包合したヤギ抗マウスIg (TAGO、バーリングラム、カリフォルニア) とインキュベーションした。次いで、この細胞を洗浄して、EPICSプロファイル (EPICS Profile) (コールター・イムノロジー (Coulter Immunology)、ハイアリー、フロリダ) 上でフローサイトメトリーにより分析した。

EL-246mAbのL-セレクトリン/P-セレクトリンキメラに対する結合のパターンを用いて、EL-246エピトープが存在するL-セレクトリンのドメインを決定した。コントロールとして、LAM1-3 (コールター)、LAM1-1およびLAM1-14mAb、であってそれぞれレクチン、L-セレクトリンのEGFおよびSCRドメイン内のエピトープを画定するもの (カンサス (Kansas) ら、1991年、J. Cell. Biol., 114:351-358; スペルチニ (Spertini) ら、1991年、J. Immunol., 147:942) およびAC1.2mAb (スーリン (Hsu-Lin) ら、1984年、J. Biol. Chem., 259:9121) であって、P-セレクトリンのSCRドメインにおけるエピトープを同定するもの (ローゼン (Rosen)、1990年、Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 3:397-402) を用いた。EL-246は特異的に天然のL-セレクトリンを認識したが、L-セレクトリン由来のレクチンドメインのみを含むL2Pは認識しなかった (図8)。分析は、実施例1に記載の方法により、フローサイトメトリーによって行った。従って、EL-246エピトープはL-セレクトリンのレクチンドメイン内にはなかった。更に、EL-246は、L-セレクトリンのEGFドメインのみがP-セレ

クチンのEGFドメインで置換されたL2P3Lを認識した。従って、EL-246は、L-セレクチンのSCRドメインを含むセレクチンのみを認識する。これらのデータは、EL-246エピトープの少なくとも一部がL-セレクチンのSCRドメイン内部にあるかまたはこのドメインを必要とすることを示している。

これらの結果を支持する追加のデータは、EL-246はL-セレクチンのレクチン活性をブロックせず、またはL-セレクチンドメインを認識する4種のmAbs (DREG200、DREG55、DREG56およびLeu-8) の結合を交差ブロックすることである。

実施例7

L-セレクチン依存性の白血球移動を抑制する方法

L-セレクチンに依存する白血球の移動を抑制するための本発明の抗体または抗原に結合するフラグメントを使用する方法は、文献に記載されている (ジュティラ (Jutila) ら、1989年、J. Immunol., 143:3318、参考として本明細書に引用)。

イン・ビボでの炎症性好中球のホーミングの抑制における抗体を実証するため、2つの方法を用いることができる。第一のものは、ローゼン (Rosen) とゴードン (Gordon) の方法 (1987年、J. Exp. Med., 166:1685) の改良法である。マウスに、腹腔内にチオグリコレートブロス1mlで炎症を誘発する1時間前に各種の抗体または塩溶液のみ500 μ gを静脈内注射した。3時間後にマウスの腹腔をHBSS10mlで洗浄し、各動物について新たに到達した腹膜好中球の数を評価する。末梢血も各動物から採取し、RBCsを溶解し、循環する好中球の抗体処理の効果を定量する。各動物の腹膜および末梢血中の好中球の割合を、好中球抗体RB6-8C5で染色後FMF分析によりおよびライトの染色差 (Wright's stain differentials) によって決定する。FMF分析は、ジュティラ (Jutila) ら、1988年、Eur. J. Immunol., 18:1819に記載の方法によりHACS Star[®]またはFACScan[®] (ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickison)、マウンティン・ビュー、カ

リフォルニア) 上で行った。抗体ブロッキングデーターを、媒質コントロールの百分率として表している。

第二の方法は、レビゾーン (Lewisohn) らによって用いられた方法である (1987年、J. Immunol., 138:4313) 骨髓好中球を文献記載の方法によりFITC (シグマ (Sigma)) で標識し (ブッチャー (Butcher) ら、Handbook in Exp. Immunol., 57. 1-57. 3)、

次に $2 \sim 5 \times 10^7$ 個の細胞を、3時間前にチオグリコレートブロス1~2mlを腹腔内に投与したマウスに静脈内注射する。FITC標識した骨髓好中球は、イン・ビボで炎症の部位に効果的に局存化する (レビンゾーン (Lewinsohn) ら、1987年、J. Immunol., 138:4313)。炎症を起こした腹腔内に蓄積した細胞は、FMFで分析したところ、50,000個であった。データーは、FITCで標識したドナー好中球対炎症を起こした腹腔内の未標識宿主好中球の割合として記録される。未標識宿主好中球は、所定の動物における炎症の程度についての基準として働く。通常は、炎症を起こした腹膜に蓄積するFITCで標識した好中球の割合は2~8%の範囲である。ブロッキングの検討には、FITCで標識した好中球に飽和濃度の本発明の抗体を氷上で20~30分間プレコートする。細胞を洗浄し、3時間前にチオグリコレートを投与した動物に注射する。それぞれのマウスの腹腔から単離した50,000個の細胞を、FMFにより分析する。抗体をコーティングした細胞のクリアランスを、各試験動物からの末梢血濃度を検討することによって評価する。各動物の腹膜および血中におけるFITCを標識した好中球対未標識の宿主好中球の割合を測定する。抗体処理後のデーターは、媒質コントロールの百分率として表される。抗体ブロッキングの特異性は、腹膜におけるFITCで標識した好中球のパーセントを末梢血中のFITCで標識した好中球のパーセントで破ることによって各動物についてSERを計算することによって測定する。(SER = FITC好中球 / 腹膜内宿主好中球 / (FITC好中球 / 宿主好中球) 血液。炎症部位の好中球の局在化が循環からの抗体をコーティングした細胞のクリアランスによってブロックされると、SER値は塩溶液コントロールに近くなる。

実施例 8

肺炎および皮膚炎の予防および治療に有用な抗体のスクリーニング法

肺炎および皮膚炎の予防または治療における本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントの有効性を示す方法は、ムリガン (Mulligan) らの文献に記載されている (1991年、J. Clin. Invest., 88:1396-1406、参考として本明細書に引用)。

モノクローナル抗体

L-セレクトインおよびE-セレクトインに対する抗体は、実施例1に記載の方法によって生成させる。

コントロール (非セレクトイン結合性) モノクローナル抗体は、ペプシン消化により誘導される $F(a b')_2$ フラグメントからなっている。肺および皮膚の血管の損傷の免疫複合体の検討には、本発明の抗体またはコントロール $F(a b')_2$ を総量で $135 \mu g$ を3個の等量に分割した投与量でウシ血清アルブミン (BSA) および抗-B SA (ウシ血清アルブミンに対する抗体の濃度が高いウサギポリクローン性 Ig G からなる) の気管内点滴または皮内注射の2.5、3.0および3.5時間後に静脈内投与する。ネガティブコントロール動物は、BSAを投与していない。

免疫複合体による肺炎および皮膚脈管炎の動物モデル

抗-B SA濃度が高いウサギのポリクローン性 Ig G を用いて、肺および皮膚の脈管の損傷を誘発させる (ジョンソン (Johnson) およびワード (Ward)、1981年、J. Immunol., 126:2365)。Ig G はオルガノン・テクニカ (Organon Tekniga)、ウェスト・チェスター、ペンシルバニアから購入した。ラットに投与するのに用いる Ig G 抗-B SA および B SA (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)、セントルイス、ミズーリー) 製剤は、リムルス・アメボサイト・リゼート・アッセイ (E-toxate、シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Co.)) によって測定したところ、それぞれ内毒素活性は $20 pg/ml$ および $12 pg/ml$ であった。総ての検討には、300~350 g の雄ロングーエバンス (Long-Evans) 特異性無菌ラッ

ト (チャールズ・リバー・ブリーディング・ラボラトリーズ、インコーポレーテッド (Charles River Breeding Laboratories, Inc.)、ウィルミントン、マサチューセッツ) を用いた。鎮静および麻酔には、ケタミン (25~50 mg/100 g 体重) およびペントバルビタールナトリウム (5 mg/100 g 体重) を腹腔内に投与する。免疫複合体による肺損傷は、100 mg BSA (1.0 ml 塩溶液中) を静脈内投与し、抗-BSA を 300 μ l 中で気管内に点滴することによって誘発させる。下記の気管内投与量の抗-BSA を用いた。0.75 mg、1.50 mg、2.50 mg、または 3.33 mg。損傷を生じてから4時間後にラットを屠殺

し、1.0 ml の塩溶液を肺動脈に注入して肺循環を洗浄した。肺損傷の尺度としての透過係数は¹²⁵I で標識したアルブミンを実質中への漏れを1.0 ml の血液に残っている量と比較することによって測定する。

逆の受動性の皮膚アルツス反応は、0.10 ml の容積中に含まれる抗-BSA を0.10~0.84 mg を皮内注射した後、10 mg BSA を1.0 ml 塩溶液に溶解したものを静脈内投与することによって誘発させる。ラットを4時間後に屠殺し、透過係数は血液1.0 ml 中に含まれる放射能と比較した全厚みの皮膚生検に含まれる放射能の比率を測定することによって計算した。ネガティブコントロールには、抗-BSA を注射したが、BSAK 静脈内投与は省いた皮内部位を有する動物を含む。

肺または皮膚出血を評価するため、赤色血液細胞 (RBC) を正常な成熟したロングエバンスラットから得たヘパリン処理した血液から採取する。9 ml の血液を1:1,000 (重量/重量) のヘパリンを含む塩溶液40 ml で希釈する。これに100 μ Ci の⁵¹Cr を加えた後、連続振盪により37℃で1時間インキュベーションする。1,000 rpm (4℃) 6分間遠心分離した後、細胞をPBSで3回洗浄し、次いで使用する準備をする。動物にBSAおよび抗-BSA を投与してから半時間後、⁵¹Cr で標識したRBC (80,000 CCI Dを含む45 μ l) を投与する。屠殺時に、皮膚部位および塩溶液を灌流させた肺の⁵¹Cr 放射能を測定し、血液1.0 ml 中に含まれるカウント数と比較した。

それぞれの実験の終了時には、各動物からの血液試料を遠心分離し、細胞および血清中の放射能を測定した。免疫複合体により誘発された肺および皮膚の損傷については、上記と同じ損傷および治療プロトコルを用いる。

グリコーゲンによって誘発される腹膜浸出物

ラットの屠殺4時間前に、0.1% (重量/容量) カキグリコーゲン25 mlを腹腔内に投与すると、好中球濃度の高い浸出物が生じる。本発明のF(a b')₂フラグメント135 μ gを3つの等しい投与量に分けて治療群に静脈内投与し(2.5、3.0および3.5時間後)、腹腔内への好中球の補充についての効果を評価する。

組織ミエロペルオキシダーゼ(MPO)含量

既知数の好中球を投与した肺および皮膚部位のMPOを測定することによって最初に標準的なリファレンス曲線を得る。肺および皮膚部位を、既報のホモゲナイゼーションおよび音波処理によって抽出する(ウォーレン (Warren) ら、1989年、J. Clin. Invest., 84:1873)。上清のMPO活性を、o-ジアニシジンの存在下でH₂O₂で分解することによって生じる吸光度(460 nm)の変化によって測定する。

細胞および肺組織の免疫組織学的分析

プラスチックスライド上のラット肺動脈内皮細胞(RPAEC)の単層を、50 ng/mlのヒト組換えTNF α で4時間刺激し、PBSで洗浄し、アセトンで固定する。刺激された細胞および未刺激細胞の単層を含むスライドを、次に本発明の抗体(1.0 ng/ml)と共に45分間インキュベーションする。次いで、スライドをPBSで洗浄した後、マウスIgGに対するビオチン/アビジン-ペルオキシダーゼ系を用いて結合したmAbについて染色を行う(ベクタスタイン (Vectastain)、ベクトル・ラボラトリーズ、インコーポレーテド (Vector Laboratories, Inc.)、バリンガム、カリフォルニア)。ヘマトキシリンで逆染色した後、切片をアクアマウント (aqua-mount) (レーナー・ラボラトリーズ、ピッツバーグ、ペンシルバニア) でコーティングし、ペルオキシダーゼの反応生成物の存在について光学顕微鏡によって検討する。免疫複合体によって誘発

される肺の損傷は、前記で定義した通りと同じプロトコルを用いて得た。動物は、0、1、2、3および4時間後に屠殺する。肺を、最適切断温度 (OCT) 化合物 (マイルス・ラボラトリーズ、インコーポレーテッド (Miles Laboratories, Inc.)、エルカート、インディアナ) 8~9 mlで膨脹させ、凍結切片を正常なラットの肺および免疫複合体の肺胞内付着が行われている肺から得た。ポリ-L-リシンをコーティング化したスライド上に設置し、アセトンで固定した後、組織切片を本発明の抗体と前記と同様な方法で反応させる。

TNF α で刺激したHUV EC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) が抗体の反応性を除くかどうかを評価するために、同じ染色手続きを用いて、4時間の面積複合体反応から得られた肺を用いて、追加実験を行う。使用の前に、本発明のmAb製剤 (1.0 ng/ml) を、TNF α (50 ng/ml) で刺激したまたは未刺激

のHUV ECの単層 (5×10^6 個の細胞) の共に27℃で1時間インキュベーションした後、抗体を肺切片へ適用する。

肺および皮膚の形態学的評価

肺を、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した後、ヘマトキシリンおよびエオシン染色を行い、光学顕微鏡で観察する。皮膚試料も同様に処理する。

内皮細胞の好中球によって媒介される細胞毒性

好中球によって媒介されるRPAECの細胞毒性を、標準的な ^{51}Cr リリース・アッセイによって測定する (バラニ (Varani) ら、1985年、Lab. Invest., 53:656)。RPAECを、24ウェルの培養皿のウェルに1 mlの培養基中にウェル当たり 5×10^4 個の細胞で加える。それぞれのウェルに2 μCi のNa $^{51}\text{CrO}_4$ (ニュー・イングランド・ニュークレア (New England Nuclear)、ボストン、マサチューセッツ) を加えた後、単層を14時間インキュベーションする。次いで、TNF α を50 ng/mlの濃度で加え、単層を更に4時間インキュベーションする。次に、プレートを0.02%BSAを含むHBSS (ハンクス・バランスド・ソルト・ソリューション (Hank's balanced salt solution)) で2回洗浄して、取り込まれなかった放射能を除去する。次いで内皮細胞の単層を、使用のために準備する。抗体を用いるときには、これら

を単層に加え、30分間インキュベーションする。ヒト血中好中球を単離して、0.02%BSAを添加したHBSSに懸濁する。Abと共にインキュベーションした後、好中球を対のウェルに加えて、最終容積1.0ml中のエフェクター対標的細胞の比率を30:1とする。好中球を内皮細胞の単層上に30分間沈澱させた後、ホルボールミリステートアセテート(PMA)(50ng/ml)をウェル当たり1.0mlの容積で加える。更に、37℃で6時間インキュベーションした後、0.9mlの上清を各ウェルから採取し、懸濁液中の細胞を遠心分離によって除去する。上清液(0.5ml)を吸引し、 γ -シンチレーションカウンターで分析を行い、 ^{51}Cr 放出を測定する。

実施例9

喘息の予防および治療法

喘息の治療における本発明の抗体または抗原に結合するフラグメントの有効性

を示す方法は、米国特許出願連続番号738,633号明細書およびグンデル(Gundel)ら、1991年、J. Clin. Invest., 88:1407-1411に記載されている。これらの文献は参考として本明細書に引用したものである。

動物

動物は、体重が約4~8kgの野生の成熟した雄性カニクイザル(Macaca fascicularis)である(チャールズ・リバー・ブリーディング・ラボラトリーズ、インコーポレーテド、プライメート・インポート(Charles River Breeding Laboratories, Inc., Primate Imports)、ポート・ワシントン、ニューヨーク)。

モノクローナル抗体

抗体の保存溶液を塩溶液で希釈した後(最終濃度2mg/ml)、直ちに脚部末梢静脈に静脈内投与する。抗体又は抗原と結合するフラグメント治療薬は、抗原の吸入試験の1時間前に投与する。ELAM-1のみに特異的な抗体を、陽性コントロールとして用いることができる。ELAM-1に対する抗体(CL2)は、ピッカー(Picker)ら、Nature, 349:796(1991)に記載されているによって生成させた。

Rrs測定

呼吸器系インピーダンス (Rrs) は、ウェグナー (Wegner) ら、1984年、Respir. Physiol., 55:47に記載されている方法により、呼吸に不連続な振動数 (11個の等しい対数段階で4~40 Hz) の正弦波強制振動 (sinusoidal forced oscillation) を重ね合わせることで測定する。全振動数に互るRrsの真のまたは同相の成分の平均を算出して、Rrsの単一代表値を得る。

気管支肺胞洗浄 (BAL)

BALは、ファイバー気管支内視鏡 (オリンパス・オプティカル (Olympus Optical)、3C-10型、レイク・サクセス、ニューヨーク) を気管竜骨を通過させ、第5~第7世代の気管支に挿入する。重炭酸塩で緩衝した塩溶液 (pH 7.4、23℃) 15 mlを注入し、気管支内視鏡の導管を通して緩やかに吸引する。収集した試料を2,000 rpmで10分間遠心分離し、生成する細胞ペレット

をCa⁺⁺およびMg⁺⁺を含まないハンス・バランスド・ソルト・ソリューションに再懸濁させる。BAL処置により軽度の炎症反応を生じることが示されている。従って、肺細胞組成に対するBALが引き起こすと思われる影響を回避するため、抗原試験の前後でBALを左右の肺を交替して行う。注入した緩衝液の回収容積は試験を通じて極めて一定しており、この処置は動物には十分耐えられるものである。総白色細胞数をコールターカウンター (コールター・エレクトロニクス (Coulter Electronics)、10型、ハイアリー、フロリダ) を用いて測定する。

抗原吸入試験

抗原吸入試験物を、バード (Bird) 7Aレスピレーターおよびマイクロネブライザー (バード・コーポレーション (Bird Corporation)、8158型) を用いて、断続的な陽圧呼吸により投与する。それぞれの試験は、15回/分 (最大吸入圧20 cm H₂O) で2分間からなっていた。Ascaris summeスキ (グリーア・ラボラトリーズ、ルノーア、ノース・カロライナ) をリン酸緩衝塩溶液 (PB

S、pH 7.4) でそれぞれの動物に適当な濃度まで希釈する（直後の反応の際にRrsを200～500%増加させるのに要する投与量）。抗原試験は、それぞれの動物について14日間の間隔を置いた。各動物は試験日の前18時間絶食させる。

組織化学

BAL細胞をDiff-Quick染色（フィッシャー・サイエンティフィック（Fisher Scientific）、セントルイス、ミズーリー）で染色した細胞遠心分離調製物を用いて評価する。細胞数の差を200個の細胞を計数することによって測定し、それぞれの細胞の種類の割合を記録する。

組織学

抗原試験の前および生験のピンセットおよび気管支内視鏡による最大後期反応中に、肺の生験試料を採取する。肺脈管内皮および気道内皮上のEーまたはLーセレクトインを同定するため免疫組織化学的染色を、ウェグナー（Wegner）ら、1990年、Science、247：456に記載の方法で行う。

統計分析

データーを、分散およびフリードマンの多重範囲試験の2方向分析を用いて統計学的に分析する。

試験プロトコール

それぞれの動物を、ケタミン（4mg/kg：ケタセット（Ketaset）、ミオダーム・メディカル・サプライ（Myoderm Medical Supply）、モーリスタウン、ペンシルバニア）およびキシラジン（1mg/kg、ロンパン（Rompun）、マイルス・ラボラトリーズ、インコーポレーテド（Miles Laboratories, Inc.）、ナパービル、イリノイ）で麻酔し、カフ付き気管内チューブを挿管し、仰臥位にする。ケタミン（4mg/kg、筋肉内）を、必要に応じて補助麻酔として用いる。次に、それぞれの動物にモノクローナル抗体またはビヒクル（塩溶液）を静脈内にボラス投与する。次に、気道細胞組成を、小児用気管支内視鏡を用いて気管支肺胞洗浄（BAL）を行った後、動物を特別に設計した支持椅子に直立位に座らせる。ベースライン呼吸器系抵抗（Rrs）を約15分監視した後、抗原

試験物を吸入した（静脈内投与から1時間後）。R r sを連続的に1時間監視した後、動物を麻酔から回復させ、ケージに戻す。R r sを、抗原の吸入から4、6、8および10時間後に15分間に互って監視する。回復期の後の、後期反応をBALを行うことによって評価する（抗原試験前とは反対の肺を洗浄）。

ブラケットティング・コントロー（bracketing control）実験（ビヒクル投与）をそれぞれの動物について行い、各動物がそれ自身のコントロールとなるように試験を設計する。各試験は、14日間の間隔を置いた。

抗原を吸入する1時間前に本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントを前投与することにより、総ての動物において総白血球浸潤および浸潤好中球数が著しく減少する。本発明の抗体または抗原と結合するフラグメントを投与すると、後期気管支収縮が著しく減少するが、急性反応に対しては明確な効果はない。

実施例10

生物学的試料中のLーおよびEーセ렉チンを有する細胞の検出法

生物学

膜に結合した付着分子は、ヌクレオチド配列に基づいて当業者により遺伝子操作を行うことができる（マーリン（Marlin）ら、1990年、Nature, 34

4:70-72、参考として本明細書に引用）。Eーセ렉チンに対する完全なヌクレオチド配列（ベビラッカ（Bevilacqua）ら、1989年、Science, 243:1160-1165、参考として本明細書に引用）およびLーセ렉チンに対する完全なヌクレオチド配列（ボウエン（Bowen）ら、1989年、J. Cell Biol., 109:421-427；シーゲルマン（Siegelman）ら、1989年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5562-5566；テッダー（Tedder）ら、J. Exp. Med., 170:123-133、参考として本明細書に引用）は、文献に記載されている。コード配列とトランスメンブランおよび細胞質ドメインとを含む配列は、ムリス（Mullis）の米国特許第4,683,195号明細書に記載の方法によりPCRによって増幅することができる。EーまたはLーセ렉チンに対する遺伝子を、多数の

利用可能な真核または原核発現ベクターの一つにサブクローニングし、適当な宿主細胞系で発現させる。

E L I S A、ウェスタンブロットおよびドットブロットなどのイムノアッセイで標準として使用するには、既知量のL-セ렉チンおよびE-セ렉チンを有する細胞または細胞溶解物を、1% B S Aを含むダルベッコのリン酸緩衝塩溶液(D P B S) (B S A-D P B S)で連続希釈する。

モノクローナル抗体調製物

マウス抗-L/E-セ렉チン抗体は、実施例1に前記した方法により調製する。

試験試料の調製

試験動物からのヒト末梢血をヘパリン処理したバイアル瓶に採取し、フィコールバック(Ficoll-Paque) (ファルマシア(Pharmacia)、ウプサラ、スウェーデン)を用いることによって単離する。次に、3回洗浄したP B M Cを完全培地中に懸濁して、5%細胞懸濁液とする。細胞懸濁液2 m lを24ウェルの平底プレートの適当な数のウェルに加える。適当な時間に、各ドナーからのウェルを回収する。細胞上清を5, 600×gで5分間遠心分離し、粒状物を除去し、E L I S Aによる分析用の総ての試料が採取されるまで20℃で凍結する。上清を解凍し、10, 000×gで5分間遠心分離することによって透明にした後、

セントリコン(Centricon) 30装置で、製造業者の指示にしたがって(アミコン(Amicon)、ベバーレイ、マサチューセッツ)8倍に濃縮する。次に、濃縮した試料を、E L I S AによりE-またはL-セ렉チンについて直ちに分析する。

L-セ렉チンおよびE-セ렉チンを有する細胞についてのE L I S A

本発明の抗体をD P B Sに溶解したものを、96ウェルの平底E I Aマイクロタイタープレート(リンブロ(Linbro))に5μl/ウェルで室温で1時間加える。ウェルをD P B Sで3回洗浄した後、2% B S A-D P B S 200μlで37℃で1時間ブロックする。ウェルを空にして、L-セ렉チンおよびE-セ렉チン標準(2倍連続希釈物8~1024 ng/ml)およびL-および/また

はE-セレクトインを有する細胞を含んでいると思われる試験試料(1%BSA-DPBSで希釈したもの)を3回、37℃で1時間加える。ウェルをDPBSで3回洗浄する。ビオチニル化した抗-L/E-セレクトイン(EL-246)mAbを2 μ /ml(50 μ l/ウェル)で37℃で30分間加える。ウェルをDPBSで3回洗浄する。西洋カラシペルオキシダーゼストレプトアビジン(1:4000)(ジムド(Zymed)、サンフランシスコ、カリフォルニア)を、50 μ l/ウェルの量で、37℃で30分間加える。ウェルをDPBSで3回洗浄し、ABTS基質緩衝液で1回洗浄する。ABTS基質緩衝液を加え(50 μ l/ウェル)、ダイナテック・マイクロタイターELISAリーダー(Dynatech Microtiter ELISA reader)(410nm)上でプレートを読み、最大ODを得る。平均ODの読みを計算する。

実施例11

L-およびE-セレクトインを有する細胞の免疫アフィニティーによる精製

本発明は、遺伝病であるCD11/CD18欠損の治療に当業界で知られている遺伝子治療技術と組合せて用いることができる。機能的なCD11およびCD18遺伝子を欠く白血球は、細胞表面レセプター、L-セレクトインおよび/またはE-セレクトインを有する。本発明のmAbsを、アフィニティーカラムとして用いられる固形指示体に結合させる。アフィニティーカラムは、患者の血液などの供給源からL-セレクトインおよび/またはE-セレクトインを有する細胞を特異的に結合するので、これらの細胞を他の細胞から精製しまたは分離することができる。

これらの細胞を一旦精製したならば、CD11およびCD18遺伝子を有するDNAベクターと共に遺伝子治療を行った後、患者に再灌流されるので、機能的な付着経路が確立されている。

実施例12

好中球のみをEL-246で処理するとE-セレクトインcDNAトランスフェクタントを結合する能力がブロックされる。

E-セレクトインcDNAでトランスフェクションした線維芽細胞をEL-246で前処理すると、好中球と結合するトランスフェクタントの能力がブロックさ

れる。内皮細胞E-セレクトインおよび好中球L-セレクトインはレセプター-カウンター-レセプター対として働く能力を有するので(キシモトティーケイ(Kishimoto, TK)ら、1990年、Blood, 78:805; ピッカー、エルジェイ(Picker, LJ)、1990年、Cell, 66:921)、好中球のE-セレクトインへの結合の抑制を好中球を処理することだけで検討した。末梢血好中球を飽和濃度のE-246と共に氷上で20分間インキュベーションし、洗浄した後、ヒトE-セレクトインcDNAでトランスフェクションしたマウスL-細胞の培養物に加えた。結合に対するEL-246の効果を評価し、それぞれ抗-L-セレクトインmAb (DREG56) および2種類のイソタイプのネガティブコントロールmAb、抗-T200およびEL-81であって白血球およびE-セレクトインを染色するものと比較した。好中球を、50マイクロモルg/mlの濃度の所定の抗体で氷上で20分間処理し、洗浄した後、E-セレクトイントランスフェクタントに加えた。結合分析は、文献記載の方法に従って行った。抗体処理の効果を定量し、コントロール(未処理)細胞の結合の百分率として記録した。数値は2つの別個な実験からの8つの値の平均値±標準偏差である。図9に示されるように、EL-246は付着を64%までブロックし、DREG56は53%まで抑制し、ネガティブコントロールmAbはほとんど効果がなかった。これらの結果は、好中球のEL-246による処理により、E-セレクトイントランスフェクタントに結合する能力をブロックすることを示している。

試験を行って、FITCで標識した抗-マウスの第二段階抗体を細胞へ加えることによって結合分析を行い、フローサイトメトリー分析を行った後、EL-2

46がE-セレクトイントランスフェクタントの表面に見られるかどうかを測定した。実験に用いた好中球はEL-246で前処理し、洗浄した後、FITCを標識した抗-マウスIgの第二段階の抗体を添加した後フローサイトメトリーを行う前後の細胞表面におけるEL-246の存在について分析を行った。E-セレクトイントランスフェクタントも同様に分析した。分析の前後における好中球の表面上のEL-246の濃度を比較した。好中球を分析の開始時にEL-246で飽和したが(図10A)、E-セレクトイントランスフェクタントと同時インキュ

バージョンを15分間行ったところ、その細胞表面上には抗体は全く検出されなかった(図10B)。L-セレクチンは白血球の表面から留出することができるので(キシモト、ティー・ケイ (Kishimoto, T.K.) ら、1989年、Science, 245:1238)、試験は、結合分析中の好中球上のEL-246抗体の損失は分子の流出によるものであるかどうかを測定した。分析後に細胞表面上にEL-246を持たなくなっている好中球(10B)は、EL-246によって結合されているものとは別のエピトープを認識する第二の抗-L-セレクチンmAb (DREG56) で明るく染色された(図10C)。このことは、EL-246で処理した好中球上ではL-セレクチンの流出は起きなかったことを示している。

分析後に好中球上にEL-246がなくなっていることと対照的に、高濃度のEL-246がE-セレクチントランスフェクタントの表面上に検出された(図10E)。EL-246で処理した好中球を受け取らないトランスフェクタントは、第二段階では反応しなかったのである(図10D)。EL-246で処理した好中球に暴露した後、第二段階の抗体に暴露したトランスフェクタントの蛍光強度のレベル(図10E)は、EL-246を用いてE-セレクチンを通常の方法で間接的に染色することによって得られる蛍光のレベル(図10F)と同じであるかまたは若干高かった。これらの結果は、好中球をEL-246で前処理すると、mAbは明らかに好中球からL-細胞トランスフェクタント上のE-セレクチンへと移行する能力を有することを示している。内皮細胞E-セレクチンでも同様な結果が得られた。例えば、ヒト臍帯内皮細胞を10単位/mlのTNFで4時間処理したところ、E-セレクチンの発現が誘発された。EL-246で

前処理した好中球は、前記と同様にして内皮細胞に加えた。15分以内に、総ての好中球からEL-246が見られなくなり、これは次にサイトカインで活性化した内皮細胞の表面に見出だされた。この好中球のE-セレクチンへの結合のEL-246によるブロッキングはL-セレクチンではなくE-セレクチンのレベルで行われたものと思われる。更に、これらの結果は、好中球はEL-246をE-セレクチン発現の部位へ効率的に運ぶことができることを示唆している。

実施例 13

EL-246は活性化されたヒト臍帯内皮細胞(HUVECs)上での好中球の「ローリング」をブロックする

セレクトインは、炎症の部位への好中球および他の白血球を補充することに関与している。好中球の炎症部位への補充は、3段階に分けることができる。(1)細胞の後毛細管小静脈の活性化された内皮への最初の付着および「ローリング」、(2)好中球の活性化および内皮への強固な付着、および(3)細胞の周囲の組織への溢出(ポールソン、ジェイ・シー(Paulson, J.C.)、1992年、「付着、炎症性疾患でのその役割(Adhesion Its Role In Inflammatory Disease)、第2章、ジェイ・エム・ハーラン(J.M. Harlan)およびディー・ワイ・リユー(D.Y. Liu)監修、ダブリュ・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W.H. Freeman and Company)、ニューヨーク、ニューヨーク、pp 19-42)。セレクトインは、活性化した内皮上での好中球の最初の付着または「ローリング」に関与している。抗-付着治療により、この損傷が予防されまたは抑制される。

血管壁を通して管外の脈管組織への白血球の輸送は、微生物や異種抗原から宿主を防御し、組織の損傷を修復する上で必要である。しかしながら、ある種の環境下では、白血球-内皮相互作用により、宿主に有害な結果が生じることがある。付着および内皮横断移行(transendothelial migration)の経過中に、白血球が内皮を直接損傷させる生成物を放出し、内皮機能不全および組織の損傷を引き起こすことがある。(ハーラン、ジェイ・エム(Harlan, J.M.)ら、1992年、「付着、炎症性疾患でのその役割(Adhesion Its Role In Inflammatory Disease)、第6章、同上、pp. 117-150)。付着防止治療は、この損傷を防止しまたは抑制する。

後毛細管小静脈中の血流のイン・ビボでの剪断力および好中球のローリングを模したイン・ビトロでのフローセル系を用いて、活性化した内皮細胞層上での好中球のローリングを抑制するEL-246の能力を測定した。

新たに単離したヒト臍帯内皮細胞であって、第V I I I因子およびLDL-レ

セプター陽性であるものを、滅菌したガラス製の1.36mm毛細管（ドラモンド・サイエンティフィック（Drummond Scientific）、ブルーモール、ペンシルバニア）の内部表面で成長させて合一させた。分析の4時間前に、内皮細胞を、最大のE-セレクトンを発現する10 ng/mlのPMAまたは1 μ g IL-1（IL-1ベクター、イムネックス（Immunex）、シアトル、ワシントン）で処理した。チューブを毛細管の両端に取り付け、可変蠕動ポンプを用いて流体および細胞が再循環できるようにした。毛細管を、ビデオ顕微鏡用に改良した倒立顕微鏡の採物台の上に固定した。精製したヒト好中球を、DMEMに2% FBSを加えたものの中で 1×10^7 個の細胞/mlの濃度で系の投与した。活性化されていない内皮細胞では起きない再現性のあるローリング相互作用が、10.1 mm/秒の流速で検出された。ローリング相互作用を5分間起こさせておきながらビデオテープに収録し、次にEL-246またはイソタイプのネガティブコントロール抗体50 μ g/mlを、または両者を順次系に投与した。次に、白血球内皮細胞相互作用を10分間までビデオテープに収録した。mAbの投与前後の10～30秒の間隔で活性化した内皮細胞上でローリングする好中球の数をビデオテープ録音のそれぞれのフレームを分析することによって測定した。データーを視野対時間（秒）内のローリングする細胞の数として記録した。

EL-246を試験して、これが好中球のローリングを支持する活性化された内皮細胞の能力を抑制することができるかどうかを測定した。HUVECsを滅菌したガラス製毛細管の内部表面上で成長させ、前記と同様の方法でE-セレクトンを発現するように誘導した（EL-246染色によって確認）。毛細管を剪断条件下での白血球のリガンドとの相互作用を測定する系に設定した。イン・ビトロでのループアッセイを用いて、前記と同様に活性化された内皮細胞上でローリングする好中球の能力についてのEL-246の抗かを分析した。ローリング相互作用を確認した後、EL-246を系に投与した。顕微鏡視野でのローリン

グする好中球の数を、相互作用のビデオテープ記録から個々のフレームを解析することによって経時的に定量した。制御された剪断条件下では、活性化されたHUVECsはヒトおよびマウスの好中球のローリングの支持では極めて有効であ

った（データーは示していない）。EL-246の効果を試験するため、単離したヒト好中球間のローリング相互作用を確認した後、EL-246（最終濃度、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を閉じたループ系に投与し、好中球のローリングに対する効果をビデオ顕微鏡で10分間記録した。好中球細胞上でローリングする好中球の数を、ビデオテープの個々のフレームを解析することによってEL-246の投与の前後で測定した。図11Aは、活性化された内皮細胞上でローリングする細胞の数を時間に対してプロットしたものを示している。EL-246の投与後90秒以内に、75%を上回るローリング相互作用がブロックされ、4分後までにブロッキングは100%となった。媒質のみを投与したチューブでは、好中球のローリングに対する抑制効果は認められなかった。更に、CD44およびP-セレクチンに対する抗体は、このアッセイでは抑制効果を示さなかった（データーは示していない）。

第二のタイプの実験を行い、最終的にEL-246を投与した同じチューブ内での好中球ローリングに対するmAbの非特異的効果を制御した。前記のようにしてローリング相互作用を確認した後、イソタイプのネガティブコントロールmAb（12.2、これは好中球または内皮を認識しない）を系に投与し（ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、その効果を150秒間監視した。図11Bに示されるように、12.2はローリング相互作用を変更しなかった。180秒後に、EL-246を系に投与したところ、これはローリングを完全にブロックした（図11B）。幾つかのチューブでは、ネガティブコントロールmAbの効果の欠如が20分間に渡って見られた（データーは示さなかった）。

これらの実験の結果は、EL-246モノクローナル抗体は活性化された内皮上での好中球のローリングを抑制するその能力が独特のものであり、これをイン・ビボで好中球のローリングを抑制するのに用いて、白血球の移行と炎症を防止または抑制することを支持している。

実施例14

EL-246はE-セレクチンcDNAトランスフェクタントが末梢リンパ節HEVに結合する能力をブロックする。

末梢リンパ節 H E V 結合分析

凍結切片での H E V s および E-セレクトイン c D N A またはベクター c D N A でトランスフェクションしたマウスプレー B L 1 / 2 細胞へのリンパ球の結合のイン・ビトロでの分析は、実施例 5 で用いたものと同じであった。機能的なヒト E-セレクトインを発現するマウス L 1 / 2 細胞およびトランスフェクションされていないコントロール親細胞系を 1×10^7 個の細胞 / m l で c R P M I に再懸濁し、 100μ l をマウス末梢リンパ節の 10μ m 切片に加え、H E V 結合を評価した。細胞結合は、実施例 5 に記載したのと同様な方法で、最初にその特徴的な自己蛍光または特異的な群形態学 (plump morphology) によってそれぞれの分野における H E V を同定した後、H E V に結合した細胞を計数した。分析の後、切片を結合性細胞を暗青色に優先的に標識するチオニンで染色した。データーは、個々に記録した H E V 当たりに結合した細胞の数として計算した。トランスフェクタントに対する抗体処理の効果を、媒質のみと比較した。

ベルグ、イー・エル (Berg, E.L.)、ロビンソン、エム (Robinson, M.) らは、L-および E-セレクトインの間には結合特異性が重複していることを示した (ベルグ、イー・エル (Berg, E.L.) ら、1992 年、B i o c h e m, B i o p h y s. R e s. C o m m., 184:1048)。これらの分子は同じ炭水化物と結合し、また興味深いことには、E-セレクトイントランスフェクタントは末梢リンパ節 H E V に強く付着する (ベルグ (Berg) ら、同上)。分子相互作用は、最初のうちは、L-セレクトインに対して独特なものであると考えられていたものである (ブッチャー、イー・シー (Butcher, E.C.)、1991 年、C e l l, 67:1033)。E L-246 を試験して、これが E-セレクトイントランスフェクタントと P L N H E V との相互作用をブロックするかどうかを測定した。図 12 の顕微鏡写真に示されているように、ヒト E-セレクトイン c D N A でトランスフェクションしたマウス L 1 / 2 リンパ腫細胞系は、マウス P L N H E V へ強く結合した。このトランスフェクタントを E L-246 で処理したところ、この相互作用は完全にブロックされた (図 12)。この実験は 4 回繰り返したが、それ

ぞれの実験でのEL-246のブロッキングは100%であった。

実施例15

EL-246はイン・ビボでの末梢リンパ節へのリンパ球のホーミング(homing)をブロックする。

異種移植でのリンパ球のイン・ビボでのホーミングアッセイ

ウシリンパ球を末梢血から単離し、洗浄して、HB101(NEN)に 1×10^7 個の細胞数で懸濁し、文献に記載の方法でFITCで標識した(ジュティラ、エム・エイ(Jutila.M.A.)ら、1989年、J. Immunol., 143:3318;ジュティラ、エム・エイ(Jutila.M.A.)ら、1990年、Cell. Immunol., 132:201、参考として本明細書に引用)。これらの処置により、総てのリンパ球は100%の効率で均質に標識され、モード蛍光値は100~500であった。FITC標識したリンパ球をHBSSで洗浄し、 1×10^8 個の細胞/mlで再懸濁し、この細胞調製物を6~12週齢の雌性BALB/cマウスの外側尾静脈に投与した。4時間後に、動物を屠殺し、パイアー班(PP)、腸間膜リンパ節(MLN)、末梢リンパ節(PLN)、脾臓、および末梢血を採取した。それぞれの組織から単細胞調製物を作成した。末梢血中のRBCsを低張リーシスによって溶解した後、フローサイトメトリー分析を行い、前記の方法で形質転換したリンパ球がマウスのリンパ様組織に入る能力を定量した(ジュティラ、エム・エイ(Jutila.M.A.)、1990年、Cell. Immunol., 132:201)。それぞれの組織について、形成転換したリンパ球対宿主リンパ球の百分率を測定した。抗体のリンパ球のホーミングに対する効果を、媒質コントロールと比較した。このアッセイでの追加のコントロールは、(1)抗体で処理した細胞のクリアランスが起きないことを示すため血中濃度を測定すること、および(2)EL-246の組織に特異的な効果であった。L-セレクチンは、優先的に末梢リンパ節を通るリンパ球のホーミングを媒介する。最適の結果を得るには、ドナー動物は健康であり且つ生後1か月未満(最大比率の循環リンパ球上でL-セレクチンが最高水準に発現される年齢)でなければならない。更に、細胞の分離および標識技術には2時間以上かけることはできず、そうしなければ細胞の成長能力が低下してしまうからであった。コントロー

ル動物で異種移植でのリンパ球のホーミング（例えば、宿主の末梢リンパ節のリンパ球の少なくとも0.2%）が起きなければ、アッセイは分析には含まれなかった。

異種移植のホーミングモデルを用いて、EL-246がイン・ビボでリンパ球が末梢リンパ節へホーミングするのをブロックするのに有効であるかどうかを試験した（別のセレクトインによって媒介される機能）。短期ホーミングアッセイでは、異種移植でのリンパ球は適当な特異性でマウスのリンパ様組織へホーミングする（バルガッツェ、アール（Bargatze,R.）および（ジュティラ、エム・エイ（Jutila.M.A.））、未公表知見）。これは、ホーミングに要する主要な付着経路は哺乳類では高度に保存されていることから、驚くべきことではない（ジュティラ、エム・エイ（Jutila.M.A.）、1992年、J. Exp. Med., 175:1565；スペルチニ、オー（Spertini,O.）ら、1991年J. Immunol., 147:942；ウー、エヌ・ダブリュ（Wu,N.W.）、1988年、J. Cell. Biol., 107:1845；ウォルチェック、ビー（Walcheck,B.）ら、1992年、Eur. J. Immunol., 22:469）。このアッセイは4時間以内に完了するので、異種移植反応に関する合併症はほとんど見られない。この方法は、多数の細胞が必要であるため相同のホーミング実験が困難な大型動物からのリンパ球のホーミング能力を測定するための強力な系を提供するものである。マウスでのウシリンパ球のホーミングを検討したが、これは（1）EL-246はウシL-セレクトインを認識し、（2）多数の細胞を容易に得ることができる、（3）健康な若い動物（1か月）であって、実質的に総ての循環リンパ球がL-セレクトイン陽性である（動物が成熟すると、L-セレクトイン陽性のリンパ球の割合は減少する）動物を容易に用いることができるからである。

MEL-246または媒質のみで処理したFITCを標識したウシリンパ球を同一のマウスに投与し、4時間ホーミングさせた。インキュベーションの後、動物を屠殺して、血液および各種のリンパ様器官を回収した。未標識の宿主細胞と比較したFITCで標識した細胞の割合をそれぞれの組織について測定し、各種の処理の間で比較した。表2は、7種類の異なる実験からの組合せたデータを

示している（3回分析を行ったパイアー班を除く）。

表 2

ウシリンパ球をE L - 2 4 6 で前処理すると、マウスの末梢リンパ節へのそれらのホーミングの能力がブロックされる

組織	宿主細胞の割合 ^a		ブロッキング率 ^b
	コントロール	E L - 2 4 6	
P L N	0.4 ± 0.14	0.14 ± 0.05 (P, 0.10)	65% (n=7)
M L N	0.48 ± 0.22	0.24 ± 0.08	50% (n=7)
P P	0.45 ± 0.24	0.34 ± 0.08	25% (n=3)
脾臓	1.54 ± 0.63	1.80 ± 0.50	15% (n=7)
血液	0.66 ± 0.32	1.10 ± 0.55	減少なし (n=7)

^a 数値は、各組織からの分析した50,000個の細胞中のF I T Cで標識した細胞の割合を表しており、表示した実験の回数から平均±S E Mである。

^b 下記の様にして算出したE L - 2 4 6によるブロッキング率：100（100×E L - 2 4 6処理の後の組織中の細胞の百分率／コントロールの組織中の細胞の百分率）。コントロールは、媒質のみで処理した後、マウスに投与した細胞であった。

末梢リンパ節に見られるF I T Cで標識したコントロールリンパ球の百分率は、0.2%～1.6%であった。予想されたように、実験毎にホーミングの水準には変動性（高S E Mによって示される）が見られ、これは細胞調製物、動物、および／または他の要因における変動性によるものと思われた。この変動にも拘らず、コントロールおよびE L - 2 4 6末梢リンパ節からプールされたデーターは著しく異なっていた（65%抑制、P値0.10）。それぞれの実験内で抑制率を計算して、平均すれば、変動はずっと小さくなった（64%±10 S E M、P値<0.01で有意）。他の試験した組織の総てにおいてもブロッキングが見られたが、腸間膜リンパ節で若干有意なだけであった（P値0.30）。血液レベルは2種類の処理群では同じであったので、E L - 2 4 6処理の後のホーミングの減少は循環からの処理された細胞のクリアランスが増加したことによるものではなかった（表2）。

ネガティブコントロール抗体 (D R E G 5 5) の効果を検討した。この抗体は同じイソタイプであり、E L 2 4 6 と同じ方法で調製したが、ウシリンパ球を認識しなかった。イン・ビボの異種移植でのリンパ球のホーミングアッセイは、表 2 に記載したように行い、E L - 2 4 6 およびネガティブコントロール抗体 (D R E G 5 5 : E L - 2 4 6 と同じイソタイプであるが、ウシリンパ球を認識しない) の効果をフローサイトメトリーによって評価した。図 1 3 に示された輪郭プロットは、この実験の分析値を表しており、E L - 2 4 6、D R E G 5 5 または媒質のみ (コントロール) で処理した後脾臓および P L N へホーミングした F E T C で標識したウシリンパ球の割合を表している。それぞれの時点で 5 0, 0 0 0 個の細胞を分析し、輪郭レベルの閾値はそれぞれのプロットで同じであった。四分儀は、バックグラウンド蛍光の上限に基づいていた。

図 1 3 は、媒質のみ、D R E G 5 5、および E L - 2 4 6 で処理し F I T C で標識した細胞を投与した動物から集めたデータの代表的なサイトメトリーによる輪郭プロットを表している。また、E L - 2 4 6 は末梢リンパ節へのホーミングをブロックし、脾臓での蓄積が若干減少した。D R E G 5 5 は P L N での細胞の蓄積には効果がなかったが、脾臓への蓄積には E L - 2 4 6 と同程度まで影響した。重要なことは、試験動物での循環する E L - 2 4 6 で処理した細胞対 D R E G 5 5 で処理した細胞のレベルは 2 倍であるにも拘らず、E L - 2 4 6 は D R E G 5 5 の効果と比較して P L N へのホーミングを 7 0 % までブロックしたことである。これらの結果は、E L - 2 4 6 がこのイン・ビボモデルでは L - セレクチンの有効なインヒビターであることを示している。

実施例 1 6

虚血／再灌流の処理

E L - 2 4 6 はイン・ビボでの虚血／再灌流による損傷を改善または抑制する。

体重が約 2 4 ~ 3 0 k g のヒツジを用いて実験を行った。許容される肺虚血／再灌流モデルは、カペランスキイ、ディー・ピー (Kapelanski, D.P.) ら、1 9 9 3 年、J. Heart Lung Transplant., 1 2 : 2 9 4 - 3 0 6 に記載の方法に従って作成し、この文献は参考として本明細書に引用する。

ものである。簡単に説明すれば、ヒツジをこのペンタルナトリウムで麻酔し、フエ

ンタニルシトレートを連続投与することによって維持した。完全な麻痺は、ペンクロニウムブロミドの連続投与により維持された。

容量を調節した通気（換気容量、600 ml；吸入酸素の分画、0.53；吸気：呼気の比率、1：1；正の末端呼気圧、5.0 cm H₂O）（608通気装置；ハーバード・アパラタス・シンコーポレーテド (Harvard Apparatus Inc.)、エス・ナティック、マサチューセッツ；空気-酸素ミキサー；ゼクリスト・インダストリーズ・インコーポレーテド (Sechrist Industries Inc.)、アナハイム、カリフォルニア；正の末端呼気圧弁；ベーリンガー・ラボラトリーズ、インコーポレーテド (Boehringer Laboratories, Inc.)、ノリスタウン、ペンシルバニア）は8 mmのカフ付き気管内チューブを通して送った。ドナーの通気装置速度（10～15／分）を調節して、動脈二酸化炭素圧（P a C O₂）を約30 mm Hgとした。これらの通気装置の設定条件を、実験の終わりまで維持した。

血中およびガス中の酸素および二酸化炭素圧を、較正したマイクロクラーク・アンド・セベリングハウス電極 (micro-Clark and Severinghaus electrodes)（ノバ・バイオメディカル・コーポレーション (NOVA Biomedical Corporation)）を用いて37℃で測定した。血液pHは、較正したサンズ (Sanz) 電極（ノバ・バイオメディカル・コーポレーション (NOVA Biomedical Corporation)）を用いて37℃で測定した。血中ガス圧およびpHは体温、圧、飽和にまでトーマス、エル・ジェイ (Thomas, L.J.)、1972年のアルゴリズムを用いて補正した (J. Appl. Physiol., 33:154-8)。酸素消費 (V O₂) は、動脈および混合静脈酸素含量の差および心拍出量から計算した。二酸化炭素放出 (V C O₂) は、二酸化炭素が吸気には含まれていないものと仮定して混合呼気および呼息した微生換気における二酸化炭素圧から計算した。V O₂ およびV C O₂ は体重によって補正し、STPDに変換した。

連続換気；灌流 (V A / Q) 分布は、ワグナー、ピーディー (Wagner, PD) ら、1974年 (J. Appl. Physiol., 36:588-99) および

ワグナー、ビーディー (Wagner, PD) ら、1974年 (J. Appl. Physiol., 36:600-5) に記載の複合不活性ガス放出法を用いて計算した。不活性ガスは、37℃で窒素で平衡にすることによって血液から抽出

した。気相における不活性ガス濃度は、メガボルク (megaborc) カラム (DB 1、ジェイ・アンド・ダブリュ・サイエンティフィック (J & W Scientific)、フォルソム、カリフォルニア；ポラ・プロット・ユー (Pora Plot U)、クロムパック (Chrompack)、ミドルバーグ、オランダ) および炎イオン化および電子捕獲検出器を供えた装置 (ヒューレット・パッカード・カンパニー、メディカル・プロダクツ・グループ (Hewlett-Packard Co., Medical Products Group)、アンドオーバー、マサチューセッツ) を用いてガスクロマトグラフィによって測定した。

3時間の左肺虚血は、19匹の動物で左主肺動脈を閉塞することによって開始した。ヒツジL-およびE-セレクトインを認識するEL-246およびヒトL-セレクトインのレクチンドメインを認識するDREG56をそれぞれ8匹および3匹の動物に左肺を再灌流する10分前に投与した。それぞれの動物に、1mg抗体/kg体重の投与量の0.9%塩溶液を静脈内にボラス投与した。8匹の動物には、抗体投与を行わなかった。総ての被験動物について、生理学的パラメーターを、再灌流の開始後6時間まで様々な間隔で記録した。

8匹の未処理動物の内の5匹は、図14に示すように、6時間以内に死亡した (死亡率62.5%)。未処理動物 (虚血コントロール) は総て、再灌流の開始後30分以内に肺機能の喪失を示し、肺機能は再灌流の進行と共に低下した。肺機能の喪失は、動脈の二酸化炭素圧 (P_aCO_2) の増加を伴う動脈酸素圧 (P_aO_2) の低下によって示された。

3匹のDREG56を投与した動物の内2匹は、図14に示すように6時間以内に死亡した (死亡率66.7%)。DREG56を投与した動物は総て、実験において肺機能の喪失を示した。これらの結果は、未処理コントロールと統計的には差がなかった。従って、ヒトおよびウシのL-セレクトインのレクチンドメインを認識するがヒツジのL-セレクトインを認識しないDREG56は、ヒツジを

虚血／再灌流による損傷から保護することができなかった。

EL-246を投与した動物は8匹総てが、実験の完了まで生き残った（死亡率0）（図14）。EL-246を投与した動物は総て再灌流の開始後に直ちに肺機能を喪失した（30分以内）。しかしながら、2時間以内に、総てのEL-246を投与した動物の肺機能は著しく改善され、正常な動物の血中にみられる

PaO₂およびPaCO₂のレベルとなった。従って、EL-246は、これを投与した動物が100%生き残り、肺機能も改善されたので、イン・ビボでの有効な治療薬である。

実施例17

処理動物の血清中の抗体の飽和濃度の測定

処理を行った動物から得た血清（実施例15参照）を、EL-246又はDREG56を投与した後30分間、抗体の飽和濃度について試験した。フローサイトメトリーによるE-セレクトインおよびL-セレクトインcDNAでトランスフェクションしたマウスL1/2細胞の染色を、これらの分析に用いた。血清試料の連続2倍希釈を用いて、トランスフェクタントを染色した後、FITC-第二段階で染色し、蛍光を飽和濃度の精製したEL-246またはDREG56抗体によって生じる蛍光と比較した。トランスフェクタントの最大染色は、1:8（EL-246およびDREG56）に希釈した総ての血清試料で検出され、抗体が動物中で飽和濃度に達していることを示していた。

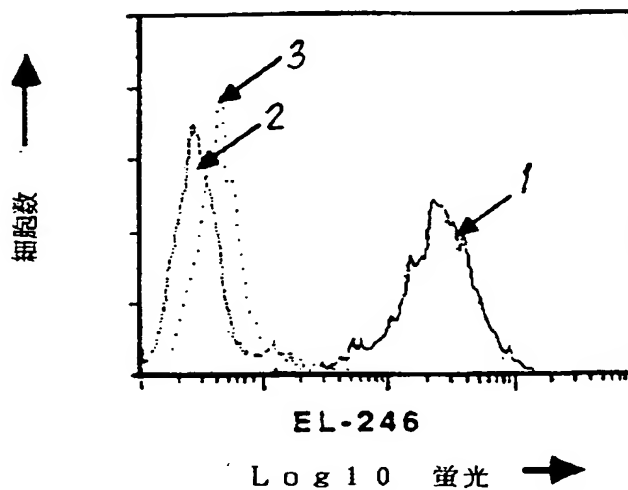
実施例18

循環しているEL-246の半減期

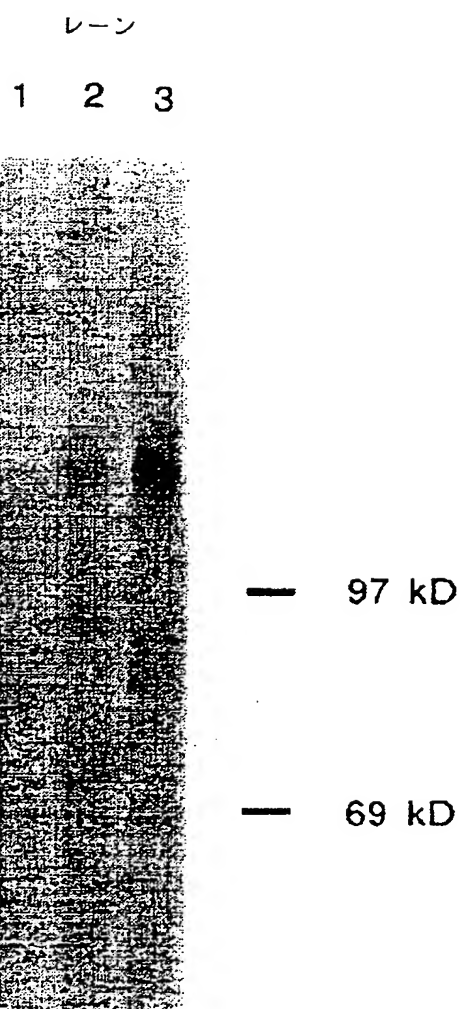
8匹の処理を行った動物の血清中のEL-246のタイターを6時間の実験中測定した（実施例15）。EL-246の濃度に、有意な低下は認められなかった。図15は再灌流の開始後30, 90および360分後に8匹の動物から採取した血清試料の様々な希釈物で処理したL-セレクトイントランスフェクタントの最大染色の百分率を示している。6時間後の力価の変動性は記載していないが（図15）、EL-246を1mg/kg投与した後の飽和濃度は、6時間維持された。従って、EL-246は循環から速やかに除かれなかった。

本明細書記載の実施例および態様は単に例示のためのものであり、これを考慮した各種の改良または変更は本出願の精神および範囲および請求の範囲内に包含されるものであることが理解される。

【図1】



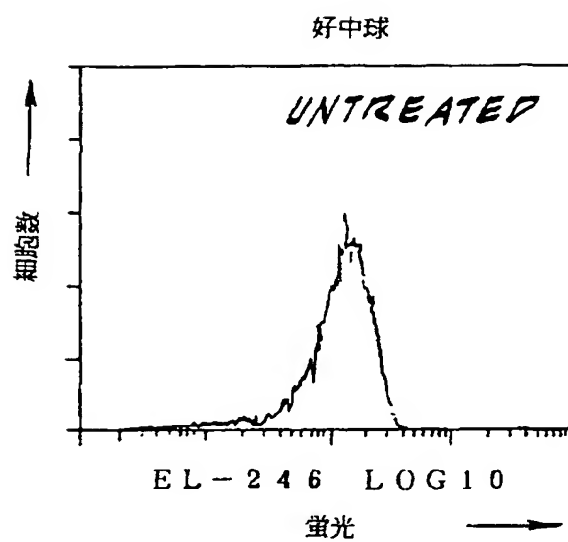
【図2】



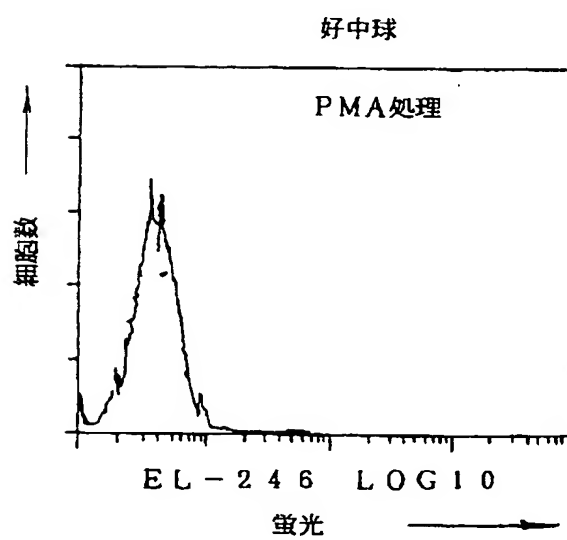
【図3】



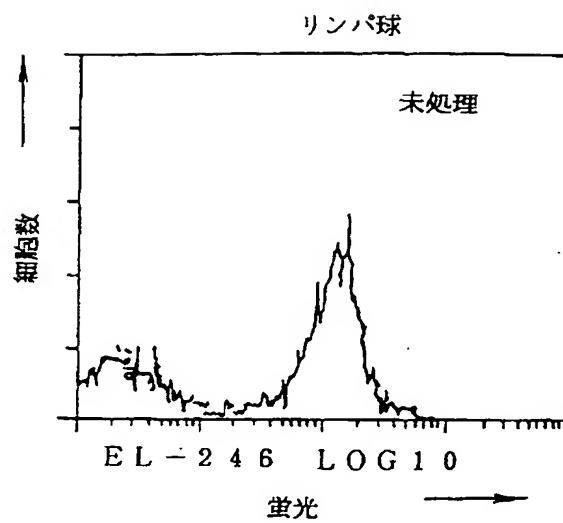
【图 4 A】



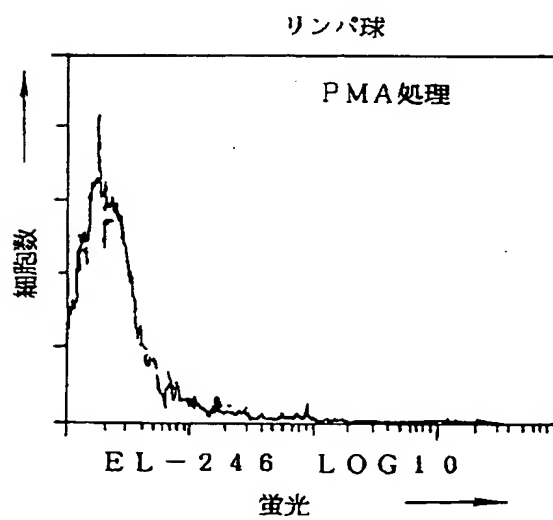
【图 4 B】



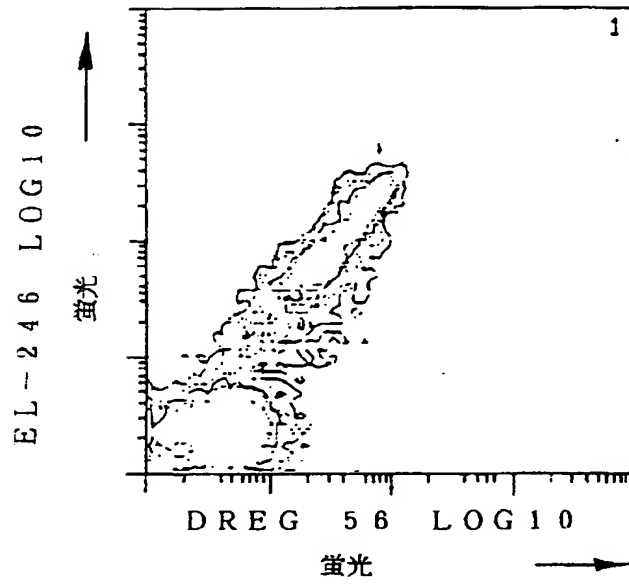
【図4C】



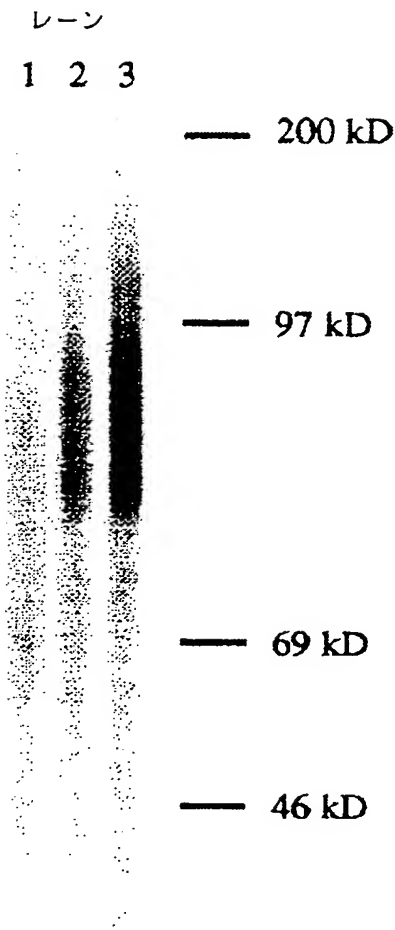
【図4D】



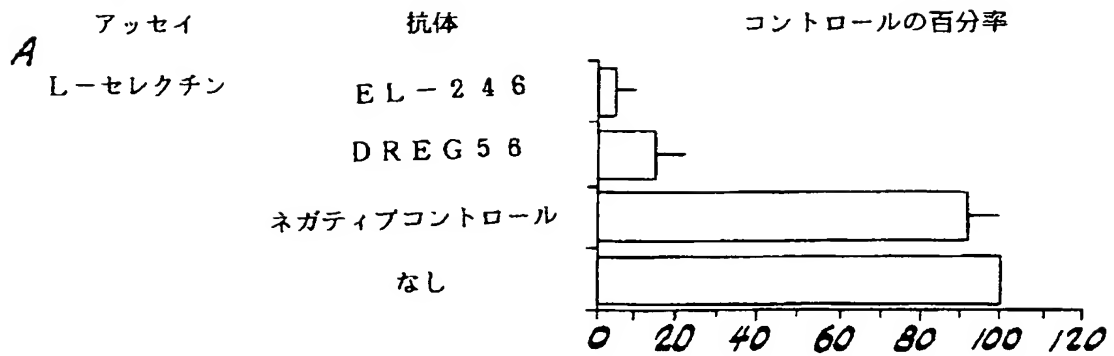
【图5】



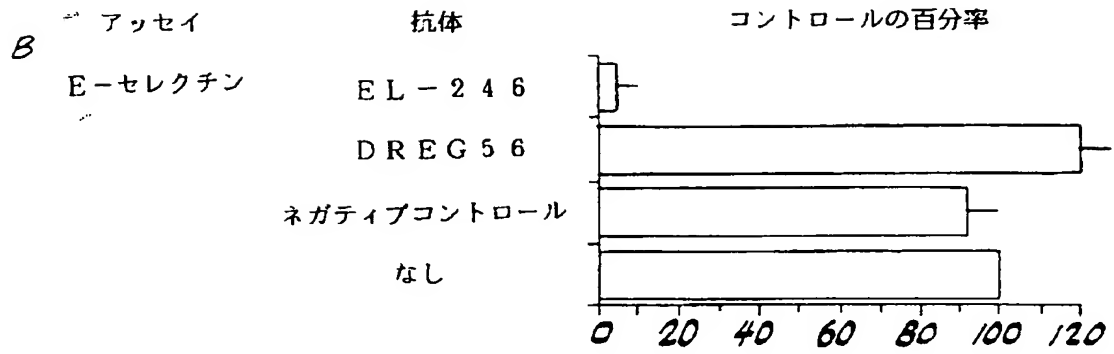
【図6】



【図7A】



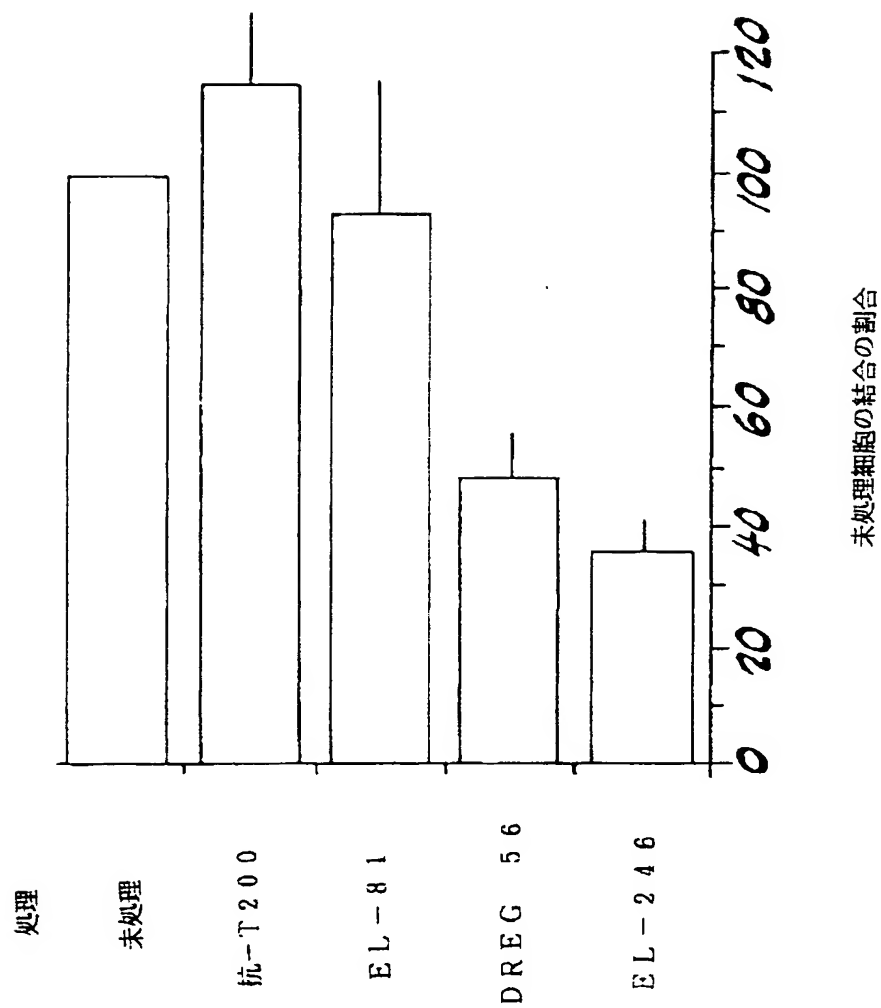
【図7B】



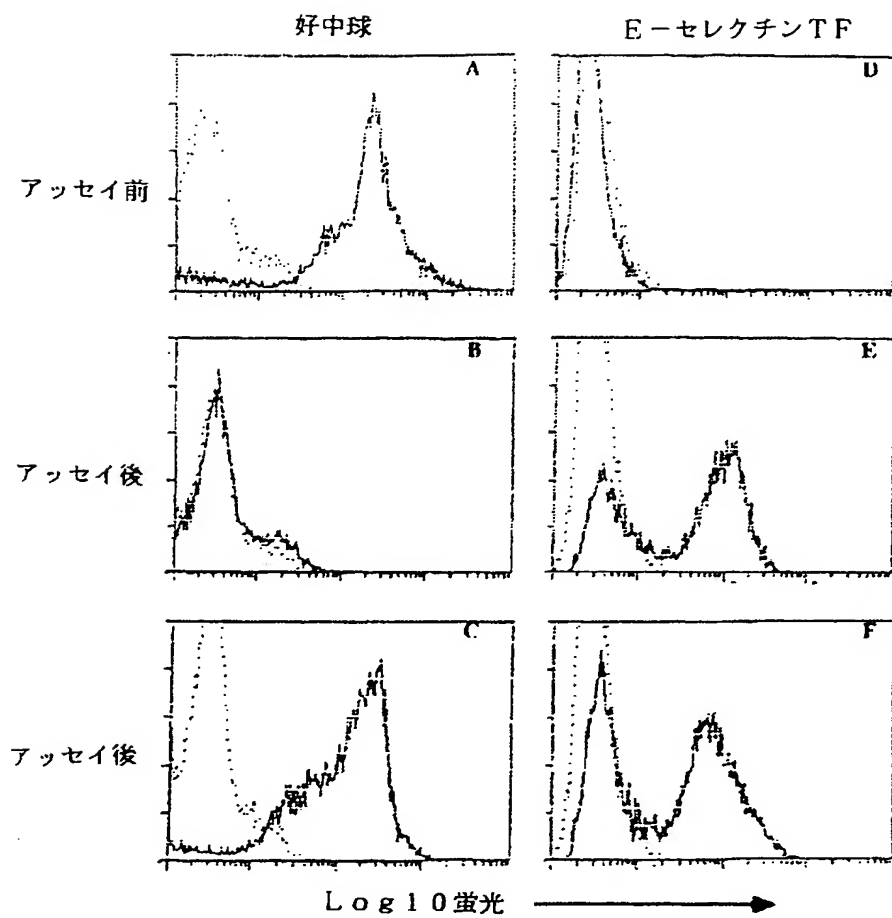
【図8】



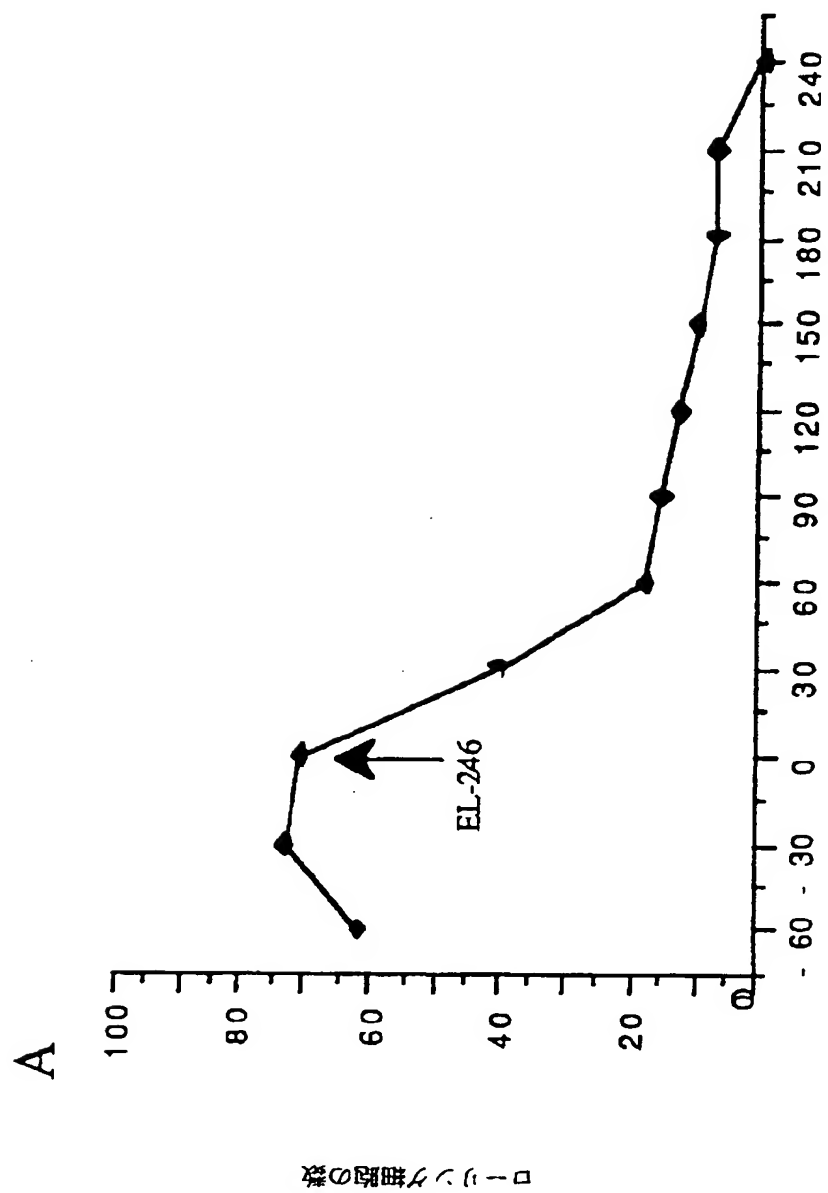
【図9】



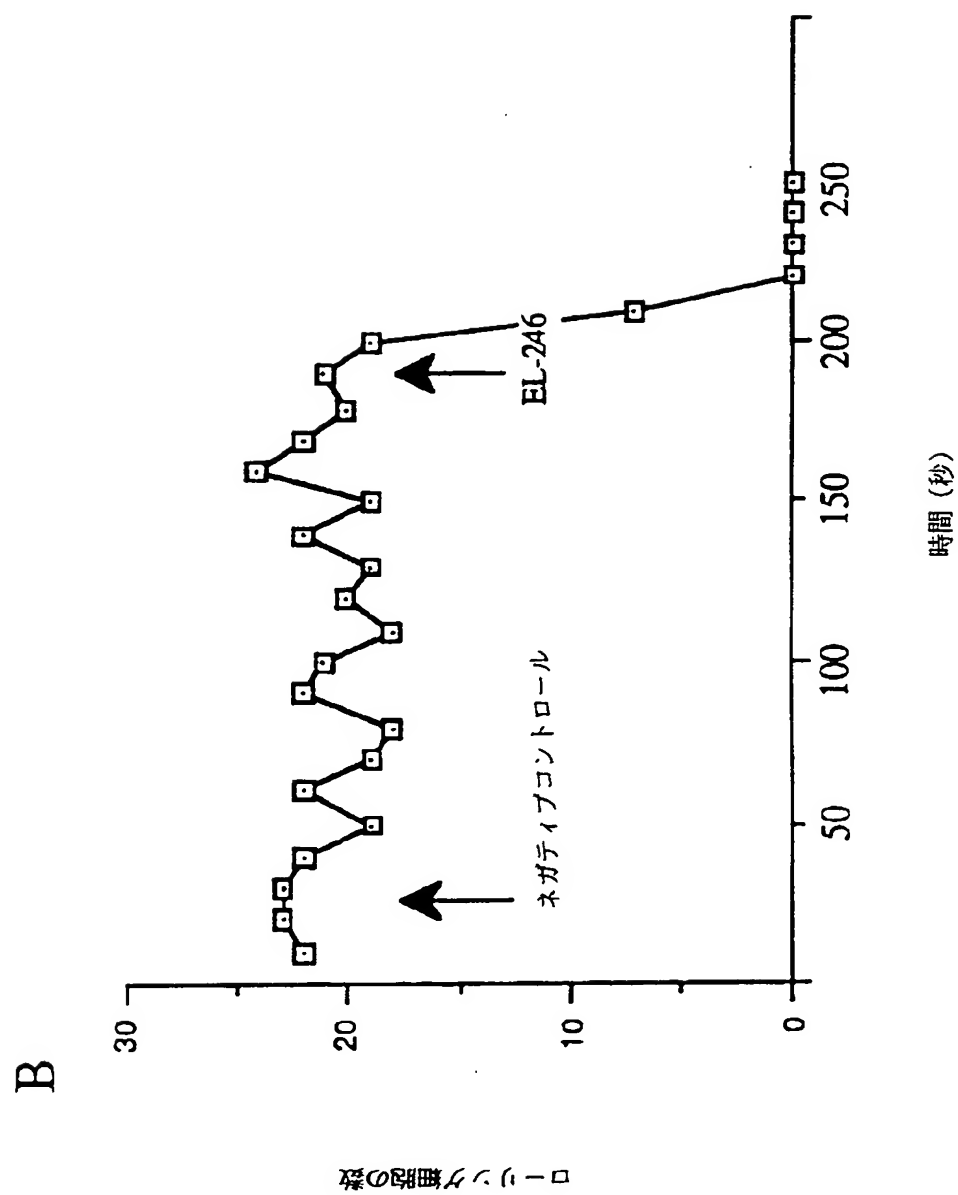
【図10】



【図11A】



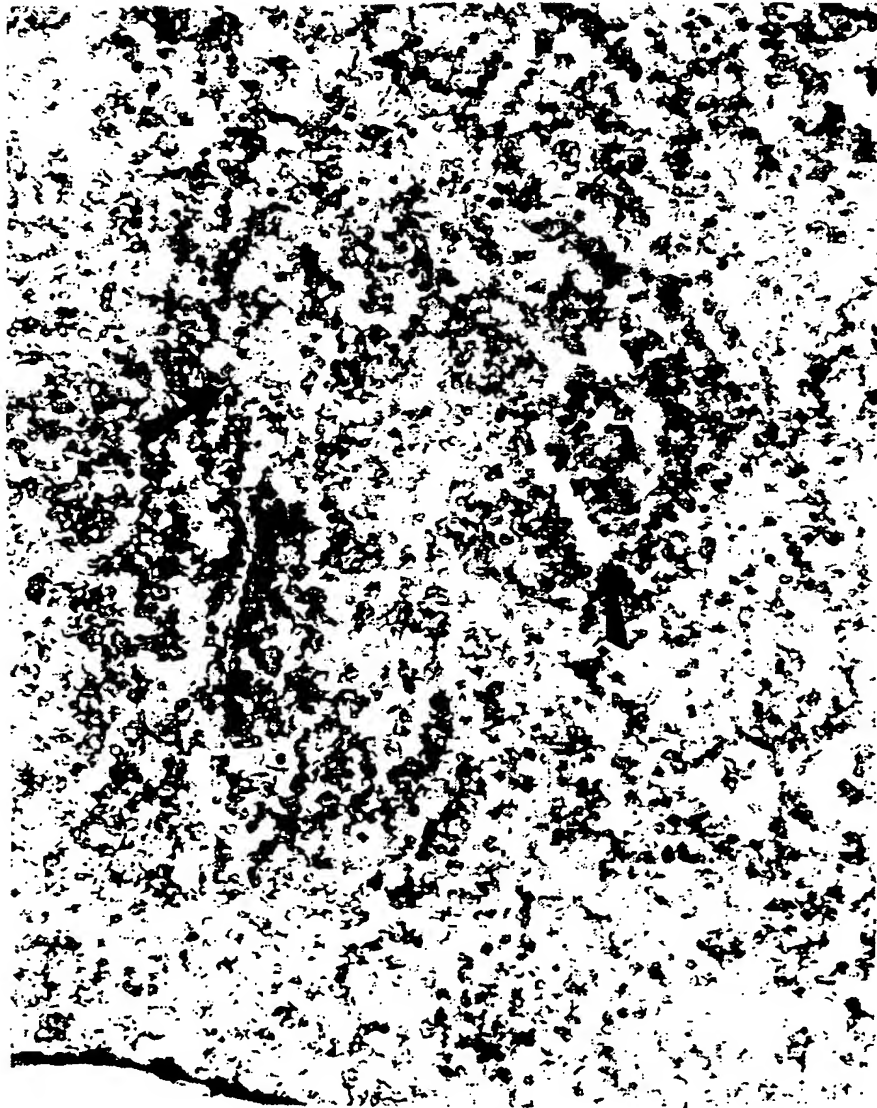
【図11B】



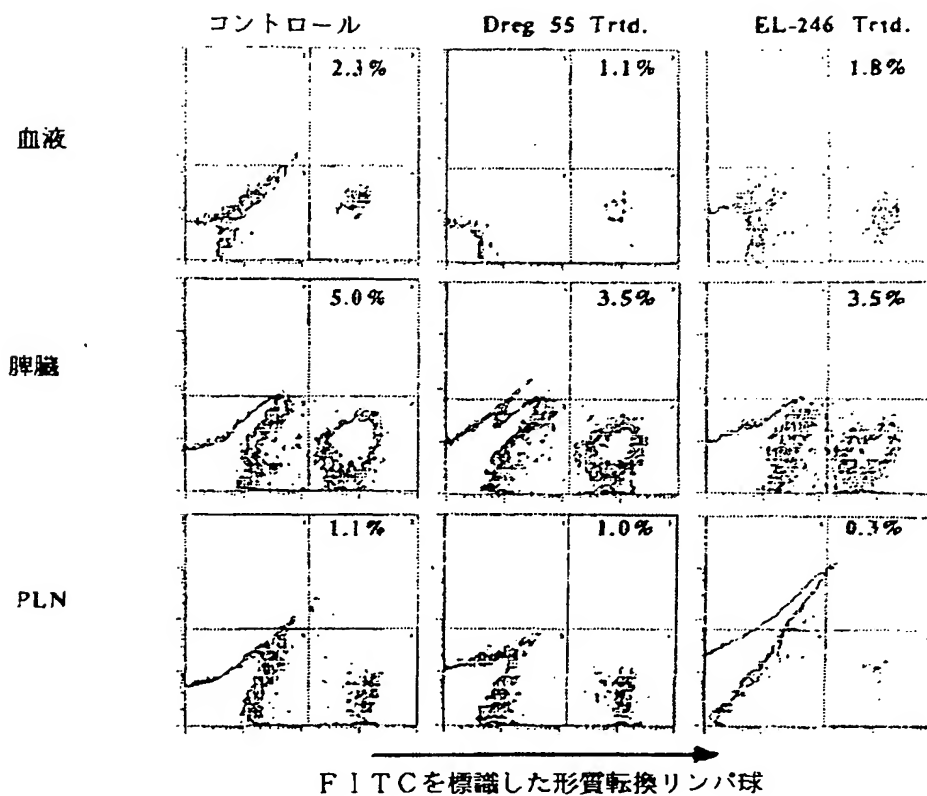
【図12A】



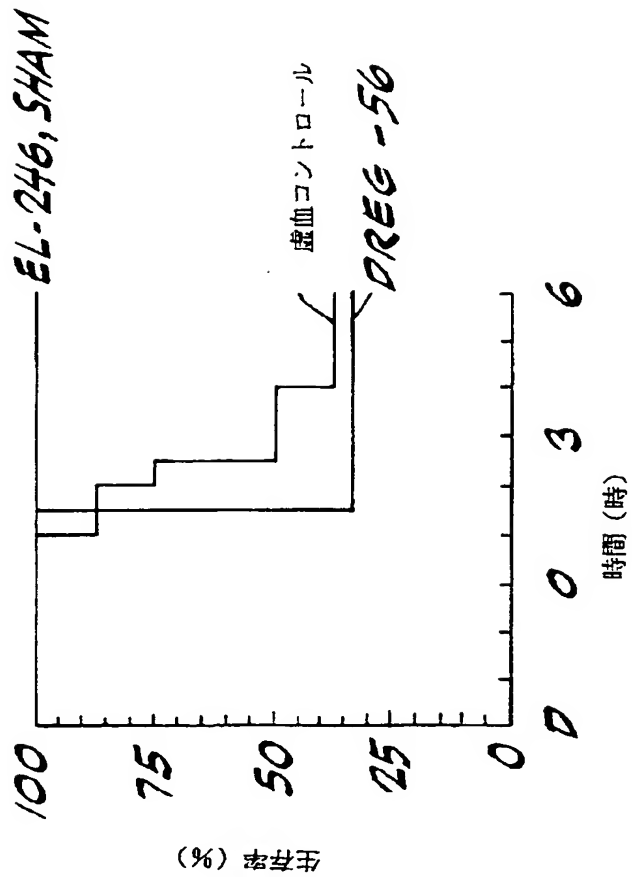
【図12B】



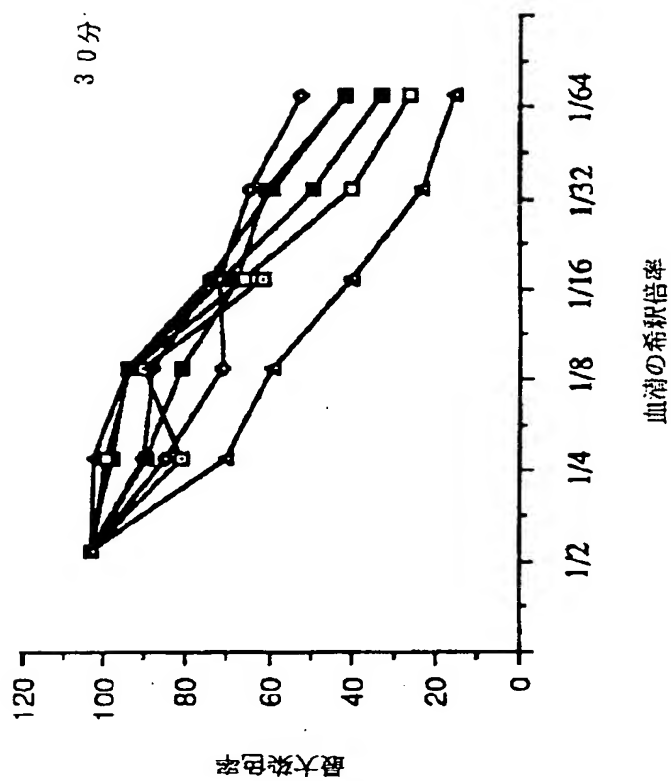
【図13】



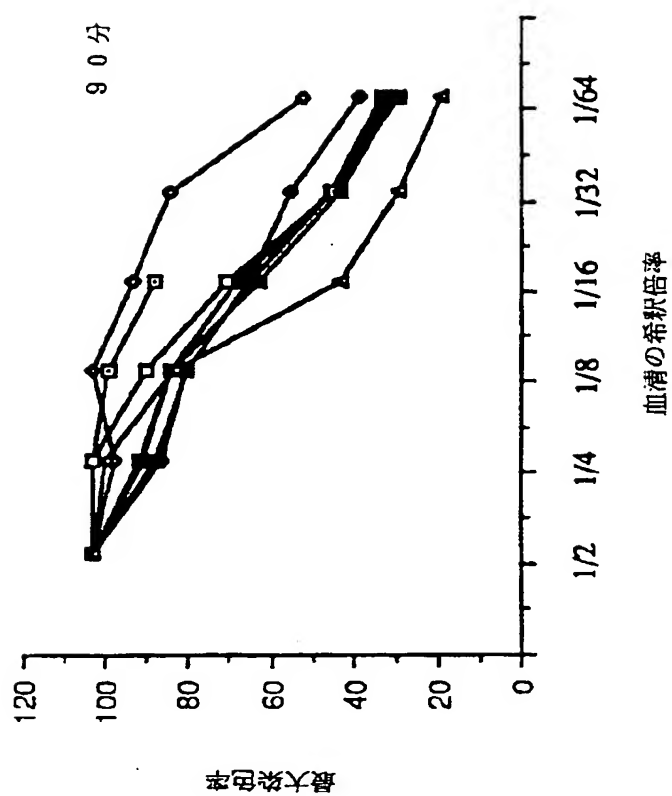
【図14】



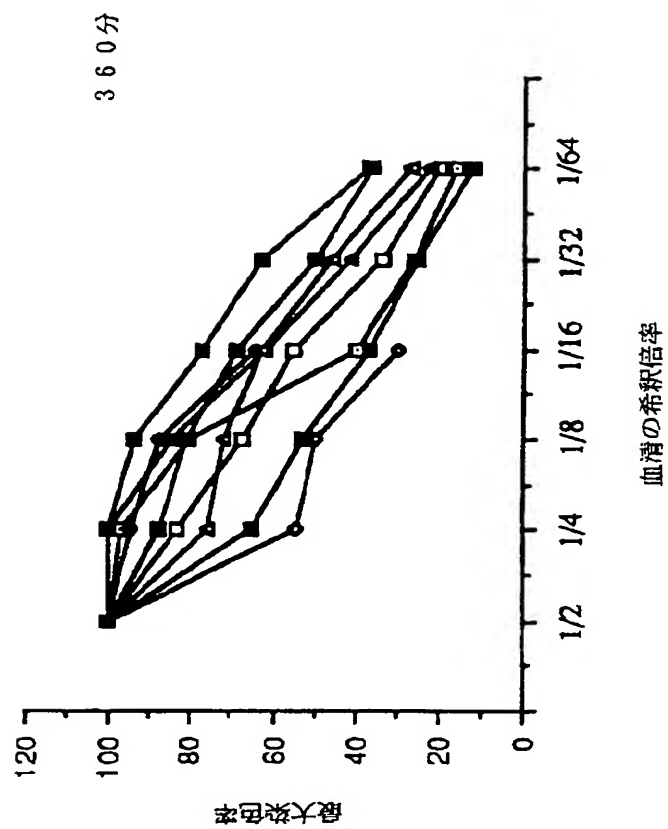
【図15A】



【図15B】



【図15C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/04999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(5) : Please See Extra Sheet. US CL : 435/240.27, 70.21, 7.21; 530/388.2; 424/85.8; 536/27 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/240.27, 70.21, 7.21; 530/388.2; 424/85.8; 536/27 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Medline, BIOSIS, EMBASE, CAS Online, WPI search terms: E-selectin, L-selectin, antibody, LAM-1, ELAM, inflammation, treatment		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proceedings of the National Academy of Science, Volume 87, issued March 1990, T.K. Kishimoto et al., "Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule", pages 2244-2248, see entire document.	1-33
Y	US, A, 5,098,833 (Lasky) 24 March 1992, see entire document.	1-33
Y	The Journal of Cell Biology, Volume 115, Number 1, issued October 1991, S.R. Watson et al., "The complement binding-like domains of the murine homing receptor facilitate lectin activity", pages 235-243, see entire document.	1-33
Y	E. Harlow, "Antibodies: a laboratory manual", published 1988, by Cold Spring Harbor Laboratory (New York), pages 72-77, 92-97, 128-135, and 141-157, see entire document.	1, 2, 6, 7, 18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 July 1993		16 AUG 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer JACQUELINE G. KRAKORIAN
Facsimile No. NOT APPLICABLE		Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04999

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	Science, Volume 258, issued 06 November 1992, L.A. Lasky, "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation", pages 964-969, see entire document.	1-33
Y,P	Journal of Experimental Medicine, Volume 175, issued June 1992, M.A. Jutila et al., "Characterization of a functionally important and evolutionarily well-conserved epitope mapped to the short consensus repeats of E-selectin and L-selectin", pages 1565-1573, see entire document.	1-33
Y	US, A, 4,935,234 (Todd et al.) 19 June 1990, see entire document.	10-17, 26-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US93/04999

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(Telephone Practice)

- I. Claims 1-7, 18-25, 30, and 31, drawn to a first composition and a first method of use, classified in Class/subclass 530/388.2 and 435/7.21.
- II. Claims 8 and 9, drawn to a second method of use, classified in Class/subclass 424/3.
- III. Claims 10-17, 26-29, 32, and 33, drawn to a third method of use, classified in Class/subclass 424/85.8.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (5):

C12N 5/18; C12P 21/08; C07K 15/28, C07H 15/00; A61K 39/395; G01N 33/577

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 39/395	ABN		
	ABX		
	ACD		
C 1 2 N 5/10			
15/02			
C 1 2 P 21/08		9358-4B	
G 0 1 N 33/53		D 8310-2J	
33/564		Z 8310-2J	
33/577		B 8310-2J	
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE,		
	DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M		
	C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG		
	, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,		
	TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, CA,		
	CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, J		
	P, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW		
	, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,		
	SE, SK, UA, US		

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : C12N 5/18, C12P 21/08 C07K 15/28, C07H 15/00 A61K 39/395, G01N 33/577	A1	(11) International Publication Number: WO 93/24614 (43) International Publication Date: 9 December 1993 (09.12.93)
(21) International Application Number: PCT/US93/04999 (22) International Filing Date: 21 May 1993 (21.05.93) (30) Priority data: 07/887,695 22 May 1992 (22.05.92) US 08/064,505 19 May 1993 (19.05.93) US (71) Applicant (for all designated States except US): THE RE- SEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE, INC. [US/US]; 1711 West College Street, Bozeman, MT 59715 (US). (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only) : JUTILA, Mark, A. [US/ US]; 3308 Sundance Drive, Bozeman, MT 59715 (US). (74) Agents: SWEENEY, John, F. et al.; Morgan & Finnegan, 345 Park Avenue, 22nd Floor, New York, NY 10154 (US).		(81) Designated States: AT, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: ANTIBODIES WITH SPECIFICITY FOR MULTIPLE ADHESION MOLECULES		
(57) Abstract The present invention involves monoclonal antibodies which recognize a common determinant found on separate and distinct adhesion molecules. The monoclonal antibodies are used for blocking cellular adhesion. Monoclonal antibodies are also described that are capable of binding to a common determinant expressed on separate and distinct selectins and in particular antibodies that bind to both E-selectin (also known as ELAM-1) and L-selectin (also known as LAM-I, LECAM-1, Leu-8, TQ-1, gp 90 MEL-14 and peripheral lymph node homing receptor). The monoclonal antibodies are useful in the diagnosis, treatment and prevention of diseases associated with inflammation. The monoclonal antibodies are used for detecting cells bearing selectins. Cell lines capable of producing the above described antibodies are also described.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Germany	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Denmark	ML	Mali	US	United States of America
ES	Spain	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
FI	Finland				

ANTIBODIES WITH SPECIFICITY FOR MULTIPLE ADHESION
MOLECULES

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This is a continuation-in-part application of pending U.S. Application Serial No. 07/887,695 filed May 22, 1992.

5

FIELD OF INVENTION

This invention relates to antibodies that bind to multiple adhesion molecules and methods for treatment of diseases. Another aspect of the invention relates to immunoassays for detection of adhesion molecules.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Peripheral blood in the circulatory system of humans and mammals is comprised principally of red blood cells, i.e. erythrocytes, and white blood cells, i.e. leukocytes. The family of white blood cells is comprised of monocytes, neutrophils, eosinophils, basophils and various types of lymphocytes. Neutrophils, eosinophils and basophils are known as "granulocytes" because of their content of cytoplasmic granules.

15

Neutrophils, monocytes, eosinophils and basophils are known as phagocytes because their primary function in the human immune system is to phagocytize or ingest bacteria, microorganisms and other types of foreign materials. These cells are produced from common progenitor cells in the bone marrow of a human or animal and are known to circulate in peripheral blood and finally, enter tissues as necessary for control of infection or to participate in inflammatory reactions. However, each of the phagocytes has different functions and behaves as a related but separate system.

20

The neutrophil is the most common leukocyte in human and animal peripheral blood. One microliter of normal human whole blood contains, on average 5,000 leukocytes of which 3,075 are neutrophils, 150 are eosinophils, 25 are

25

35

- 2 -

basophils, 250 are monocytes, and 1,500 are lymphocytes.

In the response to infection or inflammation, most leukocytes are activated first to migrate to the appropriate area in response to chemo-attractant factors such as certain bacterial products, complement component, cytokines, and
5 other factors. In addition to leukocytes, these signals can also activate endothelial cells. As a result of activation, leukocytes and endothelial cells become adhesive.

This attraction process is termed "chemotaxis". Once in an area of inflammation or infection, most
10 leukocytes must establish a firm attachment to their targets. Cell adhesion is mediated through various ligand-receptor interactions. Examples include cell receptors for complement; cell receptors for the Fc or cell binding portion of antibodies; fibronectin receptors and
15 other adhesion molecules. Most of the receptors associated with adhesion are glycoproteins.

Neutrophils primarily interact with and exit the arterial-venous system (i.e., extravasate) through the endothelium of postcapillary venules. During an acute
20 inflammatory response, neutrophils are capable of exiting high endothelial venules (HEV) found within lymph nodes, a principal site of lymphocyte extravasation. Two classes of neutrophil surface antigens have been shown to be involved in this interaction - the LFA-1/Mac-1/pl50.95 (CD11a-c/CD18)
25 complex and L-selectin.

Selectins, previously called LEC-CAMs, represent a new family of adhesion proteins which regulate leukocyte entry into lymphoid tissues and sites of inflammation (Rosen, 1990 *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 3:397-402).
30 Three members of this family have been identified. Two of these, E-selectin and P-selectin (originally termed ELAM-1 and GMP-140/PADGEM, respectively), are expressed by endothelial cells. The third, L-selectin (also known as LAM-1, LECAM-1, Leu-8, TQ-1, or peripheral lymph node homing
35

- 3 -

receptor), is expressed by virtually all peripheral blood leukocytes. P-selectin is a cytoplasmic glycoprotein in endothelial cells and platelets which can be rapidly (within minutes) translocated to the cell surface upon activation with thrombin (Larsen et al., 1989 *Cell* 3:397-402; Johnston et al., 1989 *Cell* 56:1033-1044; Geng et al., 1990 *Nature* (London) 343:757-760). E-selectin is also an inducible endothelial cell surface glycoprotein, but requires 2-4 hours for expression, reflecting the requirements for *de novo* RNA and protein synthesis (Bevilacqua et al., 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9238-9242; Bevilacqua et al., 1989 *Science* (Wash. D.C.) 243:116-1112).

Both P-selectin and E-selectin are adhesion proteins for neutrophils and monocytes (Larsen et al., 1989 *Cell* 59:305-312; Johnston et al., 1989 *Cell* 56:1033-1044; Bevilacqua et al., 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:9238-9242; Bevilacqua et al., 1989 *Science* (Wash. D.C.) 243:1160-1112). A subpopulation of memory T-cells has also been shown to bind E-selectin (Picker et al., 1991 *Nature* (London) 349:796-799); (Shimizu et al., 1991 *Nature* (London) 349:799). In contrast to vascular selectins, L-selectin is constitutively expressed by leukocytes and mediates lymphocyte adhesion to peripheral lymph node high endothelial venules (HEV) by binding the peripheral vascular addressing (Berg et al., 1989 *Immunol. Rev.* 108:5-18; Berg et al., 1991 *J. Cell. Biol.* 114:343-349) and neutrophil adhesion to cytokine-activated endothelial cells (Hallman et al., 1991 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 174:236-243; Smith, et al. 1991 *J. Clin. Invest.* 87:609-618; Spertini et al., 1991 *J. Immunol.* 147:2565-2573). Recently, neutrophil L-selectin has been shown to be a potential counter-receptor for E-selectin (Kishimoto et al., 1990 *Blood* 78:805-811; Picker et al., 1991 *Cell* 66:921-933).

L-selectin is constitutively expressed on resting neutrophils in a seemingly functional form. Freshly

35

- 4 -

isolated neutrophils can bind to stimulated endothelium at a reduced temperature (4-7° C) *in vitro* (Hallmann et al., 1991. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 236; Spertini et al., 1991 *J. Immunol.*, 147:2565). However, within minutes of neutrophil exposure to low levels of chemotactic factors, L-selectin is rapidly down-regulated from the cell surface (Kishimoto et al., 1989 *Science*, 245:1238). Near complete down-regulation of L-selectin can be detected within minutes *in vitro*. This form of inverse regulation is achieved by proteolytic degradation of the L-selectin on the cell surface. A large fragment of L-selectin can be recovered from the supernatant of activated cells, suggesting that L-selectin is proteolytically clipped close to the transmembrane domain (Kishimoto et al., 1989 *Science* 245:1238).

Analysis of neutrophils which are recovered from the inflamed mouse peritoneum *in vivo* (Jutila et al., 1989 *J. Immunol* 143:3318) and immunohistological analysis of neutrophils in inflamed skin sites (Kishimoto et al., 1989 *Science* 245-1238), suggests that this inverse regulation of adhesion molecules occurs *in vivo* as well. Lymphocytes and monocytes can also shed L-selectin *in vivo* upon activation, although the kinetics are significantly slower (Jung et al., 1988 *J. Immunol* 141:4110; Jutila et al., 1990 *Blood* 76:178; Kishimoto et al., 1990 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:2244).

E-selectin is normally absent from endothelial cells. However, upon stimulation with inflammatory cytokines, endothelial cells express E-selectin within several hours. E-selectin is synthesized *de novo*, and is blocked by protein synthesis inhibitors (Bevilacqua et al., 1987 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:9238). This up-regulation of E-selectin is similar to that seen with other endothelial adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1. However, in contrast to these other adhesion molecules which remain highly expressed for over 24 hours, E-selectin

35

- 5 -

expression peaks at 3-4 hr and then is down-modulated by 8-24 hr *in vitro* (Bevilacqua et al., 1987 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 34:9238; Pobert et al., 1986 *J. Immunol* 137:1893). The time course of E-selectin expression is similar to the time course of neutrophil infiltration into acute inflammatory sites *in vivo*. These results suggest that E-selectin is involved primarily in the acute inflammatory response. E-selectin expression is also rapidly inducible *in vivo* and coincides with the influx of neutrophils (Norris et al., 1991 *J. Invest. Dermatol.* 96:763; Cotran et al., 1986 *J. Exp. Med.* 164:661; Munro et al., 1991 *Lab Invest.* 64:295; Redl et al., 1991 *Am. J. Pathol.* 139:461; Munro et al., 1989 *Am. J. Pathol.* 135:121; Leung et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 87:1805). However, in some chronic inflammatory lesions, notably some inflamed skin and synovial sites, E-selectin expression is quite prominent (Cotran et al., 1986 *J. Exp. Med.* 164:661; Koch et al., 1991 *Lab. Inves.* 64:313; Picker et al., 1991 *Nature* 349:746; Norris et al., 1991 *J. Invest. Dermatol* 96:763). Unlike L-selectin, there is no *in vitro* evidence to suggest that E-selectin is shed from the endothelial surface.

At the molecular level, all three selectins exhibit a unique mosaic structure consisting of an N-terminal type-C lectin domain, an epidermal growth factor (EGF)-like domain, and multiple short consensus repeat (SCR) domains homologous to those found in complement regulatory proteins (Johnston et al., 1989 *Cell* 56:1033-1044; Bevilacqua et al., 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9238-9242; Laskey et al., 1989 *Cell* 56:1045-1055; Siegelman et al., 1989 *Science (Wash. D.C.)* 243:1165-1172; Camerini et al., 1989 *Nature (London)* 342:78-80; Tedder et al., 1989 *J. Exp. Med.* 170:123-133). Overall these proteins share 40-60% identity at the nucleotide and amino acid level, and may have arisen by gene duplication of an early ancestral gene. The lectin domains of each selectin are

35

- 6 -

believed to be critical to the adhesive functions of the proteins, and the carbohydrate binding specificities of all three selectins have been partially defined. P- and E-selectin both recognize sialylated Lewis x (sLex) which decorates glycoproteins and glycolipids expressed by myeloid cells although differences in their binding properties exist (Phillips et al., 1990 *Science (Wash. D.C.)* 250:1130-1132; Lowe et al., 1990 *Cell* 63:475-484; Goelz et al., 1990 *Cell* 63:1349-1356, Walz et al., 1990 *Science* 250:1132; Polley et al., 1991 *Natl. Acad. Sci.* 8:6224-6228). L-selectin function is blocked by certain simple sugars, such as mannose-6-PO₄, and certain complex polysaccharides, such as the mannose-6-PO₄, rich phosphomannan (phosphomannan monoester core i.e., PPME) from the yeast (*Hansenula holstii*, Yednock et al., 1987 *J. Cell. Biol.* 104:725-731; Imami et al., 1990 *J. Cell. Biol.* 111:1225-1232, rev. in Rosen, 1990, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*). Furthermore, many antibodies which block L-selectin function recognize epitopes encoded by the lectin domain (Bowen et al., 1990 *J. Cell. Biol.* 110:147-153; Kansas, et al. 1991 *J. Cell. Biol.* 114:351-358).

Other spatially separate and distinct functional domains of the selectins may also exist. Antibodies against the mouse or human L-selectin EGF domain block lymphocyte adhesion to HEV, but have little effect on carbohydrate binding (Kansas et al., 1991 *J. Cell Biol.* 114:351-358; Siegelman et al., 1989 *Cell* 61:611-622). Studies of chimeric L-selectin/immunoglobulin constructs suggest that the SCR domains also have important functional roles for selectins (Watson et al., 1991 *J. Cell. Biol.* 115:235-243), but in contrast to the lectin and EGF domains, no function blocking antibodies have been shown to recognize this region. In addition, it is thought that the functional role of the SCRs is restricted to maintenance of proper molecular conformation, which is distinct for each selectin (Watson et

35

- 7 -

al., 1991 *J. Cell. Biol.* 115:235-243).

Even though many anti-selectin mAbs have been developed, none have been shown to have the ability of recognizing determinants on two distinct selectins. CL2, which recognizes human E-selectin, reacts with dog L-selectin, but not both in the same animal (Abbassi et al., 1991 *J. Immuno.* 147:2107-2115). Spertini et al. (1991 *J. Immunol.* 147:942) provide the functional characterization and molecular localization of at least 11 different epitopes on L-selectin, but again none of these are expressed on two different selectins. TQ-1 and Leu-8, which recognize L-selectin, also show a much more restricted pattern of staining and do not stain other selectins. None of the published anti-E-selectin or P-selectin mAbs have been shown to react with other selectins. It is intriguing that even though there is a significant level of identity at the amino acid level between the different selectins and a large number of anti-selectin mAbs have been generated, prior to this invention, no antibody has been reported to recognize an epitope shared by two different selectins.

As the primary mediators of the acute inflammatory response, neutrophils represent an essential component of the immune system. Neutrophils arise in the bone marrow, which contains a large pool of readily mobilized mature granulocytes. After release into the blood, neutrophils have a relatively short half-life (4 to 10 hr. in humans) where they exist in dynamic equilibrium between a freely blood-borne pool and a marginating pool of cells interacting reversibly with the endothelium. In response to acute inflammatory stimuli, neutrophils adhere tightly to the vascular endothelium, migrate through the vessel wall, and subsequently move along a chemotactic gradient toward the inflammatory stimulus where they respond phagocytically. The interaction of neutrophils and vascular endothelial cells is thus an essential initial step in the acute

- 8 -

inflammatory response.

While the inflammatory response of leukocytes is vital to the eradication of invading microorganisms, a substantial and convincing body of evidence indicates that inflammatory phagocytes also cause damage to various organs and tissues when these cells are activated *in vivo* by soluble inflammatory factors that are generated by inciting pathological events (Harlan, 1985 *Blood* 65:513-525). The adhesion and spreading of activated neutrophils and mononuclear phagocytes to vascular endothelial cells with the subsequent release of toxic oxidative metabolites and proteases has been implicated in the organ damage observed in diseases, such as, adult respiration distress syndrome (ARDS; shock lung syndrome), glomerulonephritis, acute and chronic allograft rejection; inflammatory skin diseases; rheumatoid arthritis; asthma, atherosclerosis, systemic lupus erythematosus, connective tissue diseases; vasculitis; and ischemia-reperfusion syndromes (ie. limb replantation, myocardial infarction, crush injury, shock, stroke, and organ transplantation). (Reviewed in Harlan, *ibid.*)

"Anti-Adhesion" therapy represents a novel approach for the treatment of those inflammatory and immune disorders where leukocyte adhesion to epithelium significantly contributes to vascular and tissue injury/damage. The present invention specifically interacts with and blocks the adhesion process, and is therefore potentially useful for such disorders.

"Anti-Adhesion" therapy has a profound effect on the inflammatory response. Skin lesions can be reduced (Arfors et al., 1987 *Blood* 69:338), brain edema and death produced by bacterial meningitis can be reduced (Tuomanen et al., 1989 *J. Exp. Med.* 170:959), tissue edema associated with delayed-type hypersensitivity reactions can be reduced (Lindbom et al., 1990 *Clin. Immunol. Immunopath.* 57:105), airway hyperresponsiveness in allergic asthma can be reduced

35

- 9 -

° (Wegner et al., 1990 *Science* 247:456), remote lung injury following aspiration can be reduced (Goldman et al., 1991 *FASEB J.* 5:A509), late-phase bronchoconstriction following antigen challenge can be reduced (Gundel et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1407), permeability edema in acute lung
5 inflammation can be reduced (Mulligan et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1396) and the development of auto-immune diabetes can be inhibited (Hutchings et al., 1990 *Nature* 346:639). "Anti-Adhesion" therapy can also prolong cardiac allograft survival (Flavin et al., 1991 *Transplant, Proc.* 23:533),
10 attenuate lung damage and dysfunction secondary to oxygen toxicity (Wegner et al., 1991 *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:A544), attenuate renal allograft rejection (Cosimi et al., 1990 *J. Immunol.* 144:4604), ameliorate antigen-induced arthritis (Jasin et al., 1990 *Arthritis Rheum.* 33:S34),
15 protect against vascular injury and death in endotoxic shock (Thomas et al., 1991 *FASEB J.* 5:A509), and prevent second degree burns from becoming third degree burns (Bucky et al., 1991 *Proc. Amer. Burn Assoc.* 23:133).

Such "anti-adhesion" therapy is also efficacious
20 in ischemia and reperfusion injury. Such therapy can be used to reduce permeability edema following ischemia-reperfusion (IR) of intestine (Hernandez et al., 1987 *Am J. Physiol.* 253:H699), to reduce myocardial damage following myocardial infraction (Winqvist et al., 1990 *Circulation*
25 82:III; Ma et al. 1990 *Cir. Res.* 82:III), to reduce vascular and tissue damage following hemorrhagic shock and resuscitation (Mileski et al., 1990 *Surgery* 108:206), to reduce central nervous system damage following I/R of the spinal cord (Clark et al., 1991 *Stroke* 22:877), to reduce
30 edema and tissue damage following frostbite and rewarming (Mileski et al., 1990 *Proc. Am. Burn Assoc.* 22:164), and to reduce infarct size following I/R of myocardium (Simpson et al., 1990 *Circulation* 81:226).

Monoclonal antibodies to L-selectin prevent
35

- 10 -

neutrophil emigration into inflamed skin (Lewinsohn et al., 1987 *J. Immunol.* 138:4313), prevent neutrophil and monocyte emigration into inflamed ascites (Jutila et al., 1989 *J. Immunol.* 143:3318), and inhibit neutrophil emigration into inflamed peritoneum. Monoclonal antibodies to E-selectin inhibit neutrophil migration to the lung and thus provide a basis for their use in prevention or treatment of asthma (Gundel et al., 1991 *J. Clin. Invest.*; Mulligan et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1396). Jasin et al. provide support for the use of antibodies in inhibiting neutrophil accumulation in inflamed synovium (Jasin et al., 1990 *Arthritis Rheum.* 33:S34; Koch et al., 1991 *Lab. Invest.* 64:313), among other specific cell effects.

There exists a longstanding need for the production of monoclonal antibodies, or active fragments thereof, reactive with an epitope or antigenic determinant shared by different selectin molecules, thus permitting the effective diagnosis, prophylaxis, and treatment of the multitude of diseases related to the inflammatory and the immune response. It is beneficial to have available mAbs which can recognize multiple members of this family of cell adhesion molecules, thus providing a broader range of applicability to such diseases and injuries.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to antibodies, antigen-binding fragments of the antibodies, and their biological equivalents that react with a domain that is present on different adhesion molecules and the cells that produce the antibodies.

The present invention also relates to antibodies, antigen-binding fragments of the antibodies, and their biological equivalents that react with a domain that is present on different selectins and the cells that produce the antibodies.

The antibodies of the present invention react with

- 11 -

the different selectins including cells bearing or expressing the different selectins.

The antibodies, antigen-binding fragments of the antibodies and their biological equivalents bind to cells bearing or expressing the different selectins and inhibit the function of the different selectins.

The present invention also relates to the use of the antibodies as therapeutic agents in preventing or treating diseases wherein selectins play a role. Such diseases include but are not limited to inflammatory diseases, allergies, autoimmune diseases, asthma, arthritis and ischemia-reperfusion injury. Of particular interest is the prevention or inhibition of ischemia-reperfusion injury in the lung using the antibodies or their functional equivalents in an effective amount. Such treatment is also effective in reducing mortality in those mammals so afflicted.

The present invention also encompasses methods of detecting cells bearing or expressing different selectins. Such methods are useful for diagnosis of diseases where selectins and selectin-bearing cells play a role, and for monitoring the progression of such diseases.

Such methods are also useful for monitoring the efficacy of therapeutic agents during the course of treatment of a disease where selectins and selectin-bearing cells play a role.

The present invention encompasses antibodies, antigen binding fragments and chimeric antibodies that recognize a common antigen determinant on E-selectin and L-selectin. Antibodies of the present invention and their functional equivalents are capable of inhibiting both E-selectin and L-selectin mediated cell-cell interactions.

The present invention encompasses methods that simultaneously or individually inhibit or modulate the functions of E-selectin and L-selectin, using antibodies or

35

- 12 -

° their functional equivalents that are capable of binding to E-selectin and L-selectin.

The present invention are antibodies and their functional equivalents that are capable of inhibiting neutrophil binding to cells expressing E-selectin as well as
5 capable of preventing or inhibiting neutrophil rolling on endothelial cell layers expressing E-selectin.

The present invention are antibodies and their functional equivalents that are capable of preventing, inhibiting or modulating lymphocyte homing to peripheral
10 lymphoid tissues.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

These and other objects, features, and many of the attendant advantages of the invention will be better
15 understood upon a reading of the following detailed description when considered in connection with the accompanying drawings wherein:

Figure 1. Shows that EL-246 staining L1-2 cells transfected with human E-selectin cDNA. The arrows point to
20 histograms which represent (1) EL-246 staining of L1-2ELAM and (2) L1-2 transfectant controls, and (3) background staining (second stage control) of the L1-2ELAM transfectants.

Figure 2. Shows EL-246 recognition of a 110 kD antigen expressed by L1-2ELAM cells. The blots were probed
25 with EL-81 (anti-E-selectin, lane 3), EL-246 (lane 2), and negative control antibody (lane 1).

Figure 3. Shows EL-246 recognition of inflamed venules in frozen sections of human tonsil.

30 Figure 4. Shows EL-246 recognition of a human peripheral blood leukocyte surface antigen.

Figure 5. Shows EL-246 co-staining with anti-L-selectin antibodies.

35 Figure 6. Shows that EL-246 recognizes affinity

- 13 -

purified L-selectin in Western blots. L-selectin was affinity purified using the DREG 56 anti-L-selectin mAb, run on an 8% SDS gel under nonreducing conditions, transferred to nitrocellulose, and probed with EL-246 (Lane 2), another anti-L-selectin in mAb (DREG 152) (Lane 3), or second-stage antibody control (Lane 1).

Figure 7. Shows EL-246 blocking the function of L-selectin (A) and E-selectin (B).

Figure 8. Indicates that the location of the EL-246 epitope is in or requires the SCR domains of L-selectin.

Figure 9. EL-246 treatment of neutrophils prevents neutrophil binding to E-selectin transfectants (TF).

Figure 10. EL-246 transfers from the neutrophil to the E-selectin transfectants during the binding assay. Figure 10A shows that neutrophils treated with EL-246 stained brightly with the FITC-second stage before the assay. Figure 10B shows the lack of staining of the FITC-second stage antibody of the same cells after the assay. Figure 10C shows the cells analyzed in 10B, stained with a second anti-L-selectin mAb (DREG56). Figure 10D shows the lack of staining of the E-selectin transfectants with the FITC-second stage before the assay and Figure 10E shows staining after the assay. Figure 10F represents the results of a conventional indirect stain of the transfectant for E-selectin. The dotted lines in each histogram represent background fluorescence after staining with negative control antibodies.

Figure 11. EL-246 blocks neutrophil rolling on activated endothelial cells under conditions of shear. 11A shows the effect of EL-246 on neutrophil rolling. 11B shows the effect of an isotype negative control mAb on neutrophil rolling.

Figure 12. EL-246 blocks the binding of E-selectin transfectants to peripheral lymph node HEV.

35

- 14 -

Figure 12A represents the binding of the transfectants to PLN HEV, and Figure 12B shows the effects of EL-246 on binding to the same vessels in serial sections. Arrows point to the same vessel in the serial section Magnification 200X.

5 Figure 13. EL-246 specifically blocks the ability of bovine lymphocytes to home to mouse peripheral lymph nodes. The contour plots represent the analyses of the percentage of FITC-labeled bovine lymphocytes that homed into spleen and peripheral lymph nodes (PLN) following
10 treatment (trtd.) with EL-246, DREG 55, or medium alone (control).

 Figure 14. EL-246 treatment of ewes prevents mortality caused by Ischemia/reperfusion injury in vivo. Ewes were treated with an anti-E/L-selectin (EL-246)
15 monoclonal antibody, an anti-human L-selectin monoclonal antibody (DREG56), or received no treatment (ischemic control). The percent survival was plotted vs. time (hrs).

 Figure 15. Shows the percent of maximal fluorescence staining of L-selectin cDNA transfected mouse
20 L $\frac{1}{2}$ cells treated with dilutions of serum samples taken at 30, 90 and 360 minutes following onset of reperfusion in 8 animal treated with anti-E-/L-selectin monoclonal antibody (EL-246).

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

 The present invention includes monoclonal antibodies (mAbs), antigen-binding fragments and their functional equivalents which bind to a common antigenic determinant or epitope found on separate and distinct
30 adhesion molecules. The present invention also includes cells capable of producing mAbs which are capable of recognizing common antigenic determinants present on separate and distinct adhesion molecules. This invention includes mAbs capable of binding to common determinants

35

- 15 -

found on selectins, preferably common determinants on E selectin and L-selectin and cells capable of expressing such antibodies. This invention also involves a novel monoclonal antibody, EL-246, and the cells capable of producing the novel mAb. The cells producing monoclonal antibody EL-246
5 were deposited on May 22, 1992 under the terms of the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA, under Accession No: HB 11049.

The present invention involves monoclonal
10 antibodies and their functional equivalents which bind one or more epitopes present on the short consensus repeat (SCR) domain of both L-selectin and E-selectin and the cells capable of producing the mAbs.

The invention includes the antibodies and all
15 biologically-active fragments thereof, including Fab and F(ab')₂ fragments. Of special interest to the present invention are antibodies capable of binding to separate and distinct adhesion molecules, preferably antibodies capable of binding to separate and distinct selectins, most
20 preferably antibodies capable of binding to both E- and L-selectin which are produced in humans, or are "humanized" (i.e., nonimmunogenic in a human) by recombinant or other technology. Humanized antibodies may be produced, for example, by replacing an immunogenic portion of an antibody
25 with a corresponding, but nonimmunogenic portion (i.e., chimeric antibodies). Such chimeric antibodies may contain the reactive or antigen binding portion of an antibody from one species and the Fc portion of an antibody (nonimmunogenic) from a different species. Examples of
30 chimeric antibodies, include but are not limited to, non-human mammal-human chimeras, rodent-human chimeras, murine-human and rat-human chimeras (Robinson et al., International Patent Application 184,187; Taniguchi M., European Patent Application 1717,496; Morrison et al., European Patent
35

- 16 -

- Application 173,494; Neuberger et al., PCT Application WO 86/01533; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al., 1988 *Science* 240:1041; Liu et al., 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439; Nishimura et al., 1987 *Canc. Res.* 47:999; Wood et al., 1985 *Nature* 314:446; Shaw et al., 1988 *J. Natl. Cancer Inst.* 80: 1553, all incorporated herein by reference).

General reviews of "humanized" chimeric antibodies are provided by Morrison S., 1985 *Science* 229:1202 and by Oi et al., 1986 *BioTechniques* 4:214.

- Suitable "humanized" antibodies can be alternatively produced by CDR or CEA substitution (Jones et al., 1986 *Nature* 321:552; Verhoeyan et al., 1998 *Science* 239:1534; Beidler et al., 1998 *J. Immunol.* 141:4053, all incorporated herein by reference).

- The invention further provides methods for employing such compounds in the diagnosis, prevention and treatment of diseases, such as but not limited to those associated with the inflammatory and immune response, ARDS, glomerulonephritis, acute and chronic allograft rejection, inflammatory skin diseases, rheumatoid arthritis, asthma, atherosclerosis, systemic lupus erythematosus, connective tissue diseases, vasculitis, ischemia-reperfusion injury and cancer. The invention further provides a new research tool for the study of leukocyte-endothelium interactions and the role of adhesion molecules in disease mechanisms.

- Mammalian lymphocytes are immunized by *in vivo* immunization of the animal or *in vitro* contact with whole cells, cell extracts expressing adhesion molecules or with isolated adhesion molecules or fragments thereof. Monoclonal antibodies of the present invention which recognize both E-selectin and L-selectin are generated in response to the appropriate antigenic stimulus or immunogen. For production of the antibodies of the present invention the immunogen in the form of naturally occurring cells that

35

- 17 -

express selectins, cells transfected or transformed with L- and/or E-selectin or the selectin proteins and peptides, alone or conjugated other proteins, liposomes or the like. The immunogen contains protein regions common to both E-selectin and L-selectin, more preferably the immunogen
5 contains the SCR domain or fragments thereof.

In one embodiment, a single cell type stably expressing both human E-selectin cDNA and L-selectin cDNA is used as the immunogen for generating antibodies that react with both E- and L-selectin.

10 In another embodiment, cells stably expressing human L-selectin cDNA are used as the immunogen. In a further embodiment of the present invention, cells stably expressing the human SCR domain or a portion thereof are used as the immunogen. In another embodiment, mouse
15 lymphoma cells stably expressing human E-selectin cDNA are used as the immunogen for the generation of antibodies that react with both E-selectin and L-selectin. In another embodiment, endothelial cells expressing E-selectin following cytokine-stimulation or peripheral blood
20 leukocytes expressing L-selectin are used as the immunogen.

For *in vivo* immunizations, immunizations are repeated as necessary at intervals of up to a few weeks (e.g., 2-4 weeks) so as to obtain a sufficient titer of antibodies. The cells, cell extracts or antigenic adhesion
25 protein, peptides or fragments are carried in appropriate solutions or adjuvants. Following the last antigen boost, the animals are sacrificed and the spleen cells are removed.

Hybridoma formation and monoclonal antibody production may be effected by many different techniques
30 which are well-known in the art. Basically, the process involves first obtaining immune cells, such as those from the spleen of a mammal, which have been previously stimulated with an antigen or immunogen either *in vivo* or *in vitro*. These cells are then fused to cells, such as myeloma
35

- 18 -

cells or transformed cells, which are capable of replicating indefinitely in cell culture, thereby producing an immortal, immunoglobulin-secreting cell line. The immortal cells or myeloma cells, which is preferably murine, but may also be derived from cells of other mammalian species, including but not limited to rats and humans, is selected to be deficient in enzymes necessary for the utilization of certain nutrients, to be capable of rapid growth and to have good fusion capability. Many such cell lines or myelomas are known to those skilled in the art, and others are regularly described. Enzyme deficiencies may include, for example, thymidine kinase (TK) or hypoxanthine-guanine phosphoriboxyl transferase (HGPRT). These deficiencies allow selection for fused cells according to their ability to grow on, for example, hypoxanthine aminopterinthymidine medium (HAT). Preferably, the immortal fusion partners utilized are derived from a line which does not secrete immunoglobulin. The resulting fused cells, or hybridomas, are cultured under conditions which allow for the survival of fused but not unfused cells and the resulting colonies screened for the production of the desired monoclonal antibodies. Colonies producing such antibodies are cloned, expanded, and grown either *in vivo* or *in vitro* so as to produce large quantities of antibody (for description of the theoretical basis and practical methodology of fusing such cells, see Köhler and Milstein, 1975 Nature 256:495, the disclosures of which are hereby incorporated by reference). While such methods are described in further detail hereinafter, it will be appreciated by those skilled in the art that modifications and additions of the techniques may be made without departing from the scope of the present invention.

Individual fused cells may be grown in individual tissue culture wells. Feeder cells, such as irradiated thymocytes or other cells, may be used to increased the viability of the cells. Hybridoma culture supernatants form

- 19 -

the individual wells are assayed for antibody binding to human cell adhesion molecule cDNA transfected mammalian cells or leukocytes or the purified adhesion molecules or fragments thereof using suitable detection methods known in the art, such as enzyme-linked immunoassay (EIA) and immunodot assay. For the former, culture supernatants are placed in reaction cells which have been coated with the specific cell adhesion molecules (CAM) to which an antibody is to bind. After incubation, the reaction wells are washed, and remaining antibody bound to the antigen is detected through a labelled antibody reactive with the anti-CAM antibody. Appropriate labels include radioisotopes, luminescent substrates such as fluorescing agents and components of enzymatic labels.

The Immunodot method may also be utilized to screen for clones expressing anti-CAM antibodies (Towbin et al., 1984 *Immunol. Method* 72:313, the disclosures of which are hereby incorporated by reference). Purified CAM is applied to cellulose nitrate membrane as "dots" and allowed to dry. After blocking of non specific binding sites with a gelatin solution, the membranes are sequentially immersed in culture supernatant, an antimouse immunoglobulin-peroxidase conjugate solution and a 4-chloro-1-naphthol solution, with phosphate-buffered saline (PBS) washes in between. Clones expressing reactive immunoglobulin appear as colored dots. Other screening systems known to those in the art may be utilized.

Large quantities of monoclonal antibodies from secreting hybridomas may be produced by injecting the clones into the peritoneal cavity of mice and harvesting the ascites fluid therefrom. The mice, preferably primed with pristine or some other tumor-promoter and immunosuppressed chemically or by irradiation, may be of various strains, preferably New Zealand Black or Balb/c strains. The ascites fluid is harvested from the mice and the monoclonal antibody

35

- 20 -

purified therefrom, for example, by CM Sepharose column or other chromatographic means. High titers of antibodies may be so recovered. Alternatively, the hybridomas may be cultured in vitro or as suspension cultures, both in batch or continuous culture processes, and monoclonal antibodies recovered from the culture medium or supernatant.

The antibodies or antigen binding fragments may also be produced by genetic engineering. In this technique, as with the standard hybridoma procedure, antibody-producing cells are sensitized to the desired antigen or immunogen. The messenger RNA isolated from the immune spleen cells or hybridomas is used as a template to make cDNA using PCR amplification. A library of bacteriophages, each containing one heavy chain gene and one light chain gene retaining the initial antigen specificity, is produced using the cDNA. A combinatorial library is constructed by combining the heavy chain gene library with the light chain gene library. This results in a library of clones which coexpress a heavy and light chain (resembling the Fab fragment or antigen binding fragment of an antibody molecule).

The phages that carry these genes are transfected into bacteria. When antibody gene synthesis is induced in the transfected bacteria, the heavy and light chain proteins self-assemble to produce active antibodies that can be detected by screening with the antigen or immunogen.

The technology for expression both heavy and light chain in *E. coli* is the subject of the PCT patent applications; publication numbers WO 901443, WO 901443, and WO 9014424 and in Huse et al., 1989 *Science* 246:1275-1281, incorporated herein by reference.

In addition to recognizing or binding both E-selectin and L-selectin, the monoclonal antibodies of the present invention block the adhesive functions of both molecules. In one embodiment, the present invention is a novel mAb (EL-246) that recognizes a common epitope

35

- 21 -

expressed on both human E- and L-selectin. EL-246 blocks the function of both proteins, recognizes selectins from a variety of different animals, and its epitope is present within or requires the SCR domains of both E- and L-selectin. The present novel antibodies that react with the SCR domains inhibit the adhesive function of two distinct selectins.

Lymphocyte adhesion (L-selectin-dependent) to peripheral lymph node HEV (E-selectin-dependent) was blocked by >95% with EL-246. This inhibition was greater than that by DREG 56 anti-L-selectin blocking mAb (88%) which is an antibody that only reacts with L-selectin and not E-selectin (Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2244-2248). The carbohydrate (PPME) binding activity of L-selectin was not appreciably inhibited by EL-246 indicating the specificity of EL-246 for the SCR domain. EL-246 effectively blocks (>90%) the capacity of E-selectin, expressed in adherent L-cells, to bind human neutrophils.

The present invention may be especially useful as a therapeutic agent in acute settings, such as myocardial infarction, antigen-stimulated asthmatic reactions, or shock, or even in subacute settings such as allograft rejection. This mAb may also be an effective treatment for chronic disorders such as rheumatoid arthritis.

The antibodies or antigen binding fragments of the present invention are a useful method of prevention or treatment of asthma in mammals. The method of preventing or treating asthma using anti-selectin antibodies is detailed in U.S. Serial No. 738,633 filed on July 31, 1991, and in Gundel et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1407-1411 which are incorporated herein by reference. The antibodies or antigen binding fragments inhibit the late-phase airway obstruction which often accompanies antigen-induced asthmatic reactions. The adhesion molecule, E-selectin, mediates this phase of the reaction. Blockage of this phase by the present

35

- 22 -

invention serve as a treatment to prevent obstruction of the lung airways. The antibodies or antigen binding fragments are administered in a therapeutic dosage of 1 pg/kg to 10mg/kg body weight by bolus intravenous injection prior to or during exposure to an antigen.

5 Many pathogens or disease causing microorganisms use cell surface adhesion molecules as a means of attachment to mammalian cells. Antibodies or antigen binding fragments and their biological equivalents of the present invention may be effective in blocking or inhibiting adhesion
10 molecule-mediated binding of pathogens to mammalian cells. Moreover, antibodies, antigen binding fragments, and their biological equivalents of the present invention may be effective in blocking or inhibiting E- and L-selectin-mediated binding of pathogens to mammalian cells. Such
15 disease causing microorganisms, include but are not limited to, viral, parasitic, bacterial, and fungal pathogens, and the like.

Monoclonal antibodies of the present invention are useful as a research or investigational tool in determining
20 the diverse functional activity of selectins.

Insight into the diverse functional activity of E- and L-selectin, and the potential "homotypic" interaction of these proteins, may be gained by further analysis of the EL-246 epitope. Neutrophil adhesion to cytokine-activated
25 endothelial cells can be blocked by anti-E-selectin as well as anti-L-selectin mAbs (Bevilacqua et al., 1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9239-9241; Bevilacqua et al., 1989 *Science (Wash. D.C.)* 243:1160-1112; Hallman et al., 1991 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 174:236-243; Smith et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 87:609-618; Spertini et al., 1991 *J. Immunol.* 147:2565-2573). Kishimoto et al., 1990 *Blood* 78:805-811 showed that certain anti-E- and L-selectin mAbs are not additive in their blocking effects on neutrophil-activated
30 endothelial cell adhesion, suggesting that these two

35

- 23 -

proteins participate in the same adhesion pathway, perhaps as receptor-counterreceptor pairs. This hypothesis is supported by the observation that neutrophil binding to E-selectin cDNA transfected L-cells is blocked by anti-L-selectin mAb treatment of the leukocyte (Kishimoto et al., 1990 *Blood* 788:805-811). Picker et al. (1991 *Cell* 66:921-933) extended these findings by demonstrating that L-selectin on neutrophils is decorated by sLex carbohydrates and may preferentially present these structures to E-selectin. In contrast, Spertini et al., (1991 *J. Immunol.* 147:2565-2573) have also demonstrated that neutrophil-activated endothelial cell adhesion involves E- and L-selectin, but they found that mAbs to these proteins have additive blocking effects, suggesting separate adhesion pathways. Since EL-246 is an effective blocker of E- and L-selectin function and recognizes a different molecular region (see below) than the blocking mAbs used in the above studies, it may be useful in determining the basis for some of the discrepancies in the different reports.

Domain mapping studies using L-selectin/P-selectin chimeric proteins localized the EL-246 epitope to the SCR domain of L-selectin. The epitope on E-selectin recognized by the EL-246 mAb may also reside within the SCR domains of this selectin. The location of the EL-246 epitope in the SCRs is consistent with the inability of EL-246 to block carbohydrate PPME binding and with recent reports indicating that the SCR domains of L- and E-selectin are essential for optimal adhesive function (Watson et al., 1991 *J. Cell. Biol.* 115:235-243; Pigott et al., 1991 *J. Immunol.* 147:130). As mentioned in the background section, the lectin domain of the selectins is required for function and many blocking anti-selectin mAbs recognize epitopes encoded by this region (Bowen et al., 1990 *J. Cell. Biol.* 110:147-153; Kansas et al., 1991 *Cell. Biol.* 114:351-358; Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2244-2248). MAb for epitopes

35

- 24 -

localized in the EGF domain have been shown to inhibit adhesion mediated by L-selectin. (Polley et al., 1991 *Natl. Acad. Sci. USA* 88:6224-6228; Bowen et al., 1990 *J. Cell. Biol.* 110:147-153; Kansas et al., 1991 *Cell. Biol.* 114:351-358; Siegelman et al. 1990 *Cell.* 61:611). The data presented here extends those observations, and demonstrates that mAbs to appropriate epitopes within each extracellular domain of selectins can inhibit adhesive function.

Without being bound by theory, it is possible that mAbs inhibit adhesion as a result of direct interference with ligand binding or that binding of mAb, especially those mAbs which define epitopes outside the lectin domain, might perturb the conformation of the protein so as to indirectly impair the functional integrity of the lectin domain. If EL-246 blocks adhesion by altering the functional conformation of the selectins, this would suggest that the role of the SCRs in adhesion is similar for E- and L-selectin. This is in contrast to Watson et al. (1991 *J. Cell. Biol.* 115:234-243) who predicted that the role of the SCRs is unique for each selectin. Since EL-246 only recognizes E- and L-selectin, this latter prediction may be true for P-selectin. Thus, in addition to having greater numbers of SCR domains (9 versus 6 and 2 in E- and L-selectin, respectively) there may exist molecular differences in P-selectin SCRs which contribute to the unique functions of this molecule, such as adhesion of thrombin-activated platelets.

Additional molecular and functional characterization of the epitope recognized by EL-246 will lead to new insights into the function of the selectins and the evolutionary conservation of this family of adhesion proteins. Targets for treatments may be designed to regulate or block the epitope that is recognized by EL-246 thus regulating selectin activity *in vivo*. Importantly, new therapeutics which inhibit this site have the added

35

- 25 -

advantage of blocking the activity of leukocyte-endothelial cell adhesion by simultaneously inhibiting both leukocyte as well as endothelial cell adhesion proteins.

The monoclonal antibodies so produced have a number of diagnostic and therapeutic uses. They can be used in *in vitro* diagnostic agents to test for the presence of adhesion molecules, preferably selectins, present in insoluble form or associated with cells in mammals by subjecting biological samples or tissues or other human-derived substances to standard immunoassay protocols. The antibodies or antigen binding fragments are also useful in analysis of tissue biopsy material such as high endothelial venules, lung tissue, or any site of inflammation to detect the presence of the cells bearing the reactive epitopes. Such assays may be of a radioimmunoassay, EIA, fluorescent or chemiluminescent format or the like. In one such assay, biological sample is contacted to antibodies of the present invention and a labelled second antibody used to detect the presence of the selectin to which the antibodies are bound. In addition, many histochemical methods can be employed and are well-known in the art.

One particular assay utilizes the monoclonal antibody, EL-246 in standard techniques known in the art to carry out an enzyme-linked immunoassay as described in *Methods in Immunodiagnosis*, 2nd edition, Rose and Bigazzi, Eds., John Wiley and Sons, 1980, which is incorporated by reference, and in Campbell et al., *Methods of Immunology*, W.A. Benjamin, Inc., 1964. Such assay may be, for example, of direct format (where the labeled first antibody is reactive with the antigen), an indirect format (where a labeled second antibody is reactive with the first antibody), a competitive format (such as the addition of a labeled antigen), or a sandwich format (where both labeled and unlabeled antibody or utilized), as well as other formats described in the art.

- 26 -

In one embodiment, biological sample from a mammal is applied to an insoluble matrix or solid substrate, so as to bind the selectin on selectin-bearing cells to this matrix. This matrix is washed using a physiological buffer, such as phosphate buffered saline (PBS), to remove unbound materials. The solid antigen-bound matrix is exposed to a solution having therein an antibody of the present invention such as monoclonal antibody EL-246. The antibody is allowed to react with the antigens on the solid matrix, and the matrix is again washed to remove any unbound antibody. This complex is then exposed to a solution having therein a labeled second antibody such as goat anti-mouse IgG which is reactive with the first antibody. This antibody is preferably labeled with a component of an enzymatic reaction, such as peroxidase; a radioisotope, such as ^{125}I ; or a chemiluminescent or fluorescent substrate. The complex is again washed to remove any unbound antibody. The reaction is monitored by a means appropriate for the label chosen, such as a scintillation counter or a spectrophotometer. Biological samples appropriate for such a detection assay include, but are not limited to, tissue biopsy extracts, whole blood, plasma, serum, cerebral spinal fluid, synovial fluid, plural fluid, urine and the like.

In another embodiment, the antibodies of the present invention are applied to an insoluble matrix or solid substrate, so as to bind the antibodies to the matrix. A biological sample suspected of containing L- and/or E-selectin-bearing or lysates of such cells is added to the matrix and allowed to react with the antibodies on the matrix to form a selectin- antibody complex. The complex is detected using a labeled second antibody. The labeled second antibody is EL-246 or a biologically equivalent antibody. This method detects both L- and E-selectin, and L- and E-selectin-bearing cells if they are present in the biological sample. The assay is both qualitative or

35

- 27 -

quantitative. The assay may be modified to differentiate between L-selectin and E-selectin by using monoclonal antibodies specific for the individual selectin of interest. Such monoclonal antibodies are DREG mAbs as described in Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Sci.* 87:2244-2248.

5 The methods for detecting and quantifying L- and/or E- selectin bearing cells in biological samples are particularly useful in diagnosing disease states such as inflammatory diseases, autoimmune diseases, cancer, asthma, ischemia reperfusion injury and the like. The methods are
10 also useful for monitoring the progression of these disease states. Moreover, the method is useful for monitoring the efficacy of therapeutic agents such as anti-inflammatory agents, chemotherapeutic agents, anti-adhesive agents and the like, during the course of treatment.

15 For all such therapeutic, prophylactic and diagnostic uses, the monoclonal antibodies and other necessary reagents and appropriate devices and accessories may be provided in kit form so as to be readily available and easily used.

20 The antibodies of the present invention can be formulated into pharmaceutical preparations having therapeutic, diagnostic or other uses in mammals. The antibodies or antigen binding fragments of the present invention are especially useful in the prevention and/or
25 treatment of mammals with coronary heart disease or those in high risk categories for heart attack or stroke such as those with high blood pressure, diabetes, high cholesterol, or smokers.

30 The antibodies or antigen binding fragments of the present invention are also useful for the prevention or treatment of ischemia-reperfusion injury which occurs during or after surgery, especially after coronary bypass surgery.

 The antibodies, antigen binding fragments and their functional equivalents are especially useful in
35

- 28 -

prevention or inhibition of lung ischemia/reperfusion injury. The present invention has been shown to be an effective therapeutic agent in preventing or inhibiting loss of lung function and preventing mortality in mammals treated with an antibody that is capable of binding to E-selectin and L-selectin.

Mammals in need of treatment for lung ischemia/reperfusion injury as in the case of a lung transplant are administered an amount of antibody or their functional equivalent that is effective in preventing or inhibiting loss of lung function and preventing mortality. Such treatment of mammals prevents, inhibits, or attenuates an inflammatory response at the affected site.

The antibodies or antigen binding fragments of the present invention are also useful for the prevention or treatment of allergic rhinitis, asthma and anaphylaxis. The present antibodies are also useful in prevention or treatment of inflammatory diseases and autoimmune diseases such as Rheumatoid arthritis, Systemic lupus erythematosus, Juvenile diabetes, Sjögren syndrome, connective tissue diseases and the like.

The antibodies of the present invention, antigen binding fragments and their functional equivalents are effective in preventing or inhibiting cell-cell interactions mediated by E-selectin and/or L-selectin. The antibodies inhibit neutrophil L-selectin interactions with cells expressing E-selectin including activated endothelial cell layers, E-selectin cDNA transfectants and the like. The antibodies of the present invention prevent or inhibit E-selectin mediated neutrophil rolling on endothelial cell layers, such cell layers present in arteries, veins, capillaries, lymphoid vessels and the like. Such inhibitory effects produced by the antibodies and their functional equivalents are useful in preventing, inhibiting or modulating an inflammatory response.

35

- 29 -

The antibodies of the present invention and their functional equivalents are capable of preventing or inhibiting the binding of E-selectin expressing cells to high endothelial venule cells (HEV) present in peripheral lymph nodes.

5 Using a xenogeneic in vivo homing model, it was found that lymphocytes from humans, goats, sheep and cows home in a tissue-specific fashion to lymphoid tissues of mice after injection intravenously. These results are not surprising, since earlier observations showed that homing
10 mechanisms are highly conserved between mammals (Spertini, O et al. 1991. J. Immunol. 147:942; Wu, N.W. et al. 1988. J. Cell Biol. 107:1845; Walcheck, B. et al. 1992 Eur. J. Immunol. 22:469).

15 One aspect of the present invention is a method to prevent or inhibit lymphocyte homing to lymphoid tissue in a mammal. The antibody of the present invention inhibits the ability of lymphocytes to home to lymphoid tissue.

 Leukocytes may deliver EL-246 to sites that specifically express E-selectin. In assays where
20 neutrophils were precoated with EL-246, washed, and added to either E-selectin cDNA transfectants or cytokine-activated HUVECs, the mAb transferred from the leukocyte to E-selectin. The amount of EL-246 on the E-selectin transfectants, as measured by staining with FITC-anti-mouse
25 second stage followed by flow cytometry after transferring from the leukocyte was greater than the amount after directly staining the transfectants with saturating levels of EL-246. Shedding of surface L-selectin bound EL-246 did not account for these results, because the neutrophils which
30 lost EL-246 still stained brightly with anti-L-selectin mAb DREG 56. It is unlikely that DREG 56 reacted with new L-selectin that was translocated to the cell surface during the course of the assay because 1) the assay time was relatively short (15 min) and 2) significant intracellular

35

- 30 -

° pools of preformed L-selectin have not detected in any previous analyses of neutrophils (Jutila, M.A. et al. 1989. J. Immunol 143:3318; Kishimoto, TK et al. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2244; Jutila, M.A. et al. 1990. Cell Immunol. 132:201; Kishimoto, T.K. et al 1989 Science 245:1238). Once neutrophils have lost L-selectin in vitro, they normally die before new expression is seen. If EL-246 transfers from L-selectin to E-selectin when these molecules come in close association, then leukocytes may be an efficient delivery system for the mAb in vivo.

10 The antibodies and antigen binding fragments of the present invention are useful in prevention and treatment of infections and diseases caused by pathogenic or potentially pathogenic microorganisms. Pharmaceutical compositions comprising the antibodies, antigen binding
15 fragments of the antibodies or their biological equivalents are administered to host mammalian cells bearing adhesions molecules, preferably selectins, most preferably, L- or E-selectin.

 In providing a patient with the antibodies or
20 antigen binding fragments of the present invention to a recipient mammal, preferably a human, the dosage of administered antibodies or antigen binding fragments will very depending upon such factors as the mammal's age, weight, height, sex, general medical condition, previous
25 medical history, etc. In general, it is desirable to provide the recipient with a dosage of antibodies or antigen-binding fragments which is in the range of from about 1 pg/kg to 10 mg/kg (body weight of mammal), although a lower or higher dosage may be administered. The
30 therapeutically effective dose can be lowered by using combinations of the above described antibodies or antigen binding fragments. As used herein, one compound is said to be additionally administered with a second compound when the administration of the two compounds is in such proximity of

35

- 31 -

time that both compounds can be detected at the same time in the patient's serum.

The antibodies or antigen-binding fragments of the present invention are intended to be provided to recipient subjects in an amount sufficient to lessen or attenuate the severity, extent or duration of the inflammatory symptoms.

The antibody agents of the invention, or their fragments, may be administered either alone or in combination with one or more additional anti-inflammatory or anti-asthma agents (such as catecholamines, resorcinols, salingenins, and ephedrine), glucocorticoids (such as hydrocortisone), chromosomes (such as cromolyn sodium) and anticholinergics (such as atropine), in order to decrease the amount of such agents needed to treat the inflammatory or asthma symptoms.

The administration of the agents of the invention may be for either a "prophylactic" or "therapeutic" purpose. When provided prophylactically, the agents are provided in advance of any symptom. The prophylactic administration of the agents serves to prevent or attenuate any subsequent inflammatory response. When provided therapeutically, the agents are provided at (or shortly after) the onset of a symptom of inflammation. The therapeutic administration of the agents serves to attenuate any actual inflammatory episode. The agents of the present invention may, thus, be provided either prior to the onset of an anticipated inflammatory episode (so as to attenuate the anticipated severity, duration or extent of the episode) or after the initiation of the episode.

The antibodies may be administered by any route appropriate to the condition being treated including intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, oral, nasal and the like. Preferably, the antibody is injected into the blood stream of the mammal being treated. It will be readily appreciated by those skilled in the art

- 32 -

that the preferred route will vary with the condition being treated.

While it is possible for the antibody to be administered in a pure or substantially pure form, it is preferable to present it as a pharmaceutical formulation or preparation.

The formulations of the present invention, both for veterinary and for human use, comprise an antibody as described above, together with one or more pharmaceutically acceptable carriers and optionally other therapeutic ingredients. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the formulation and not deleterious to the recipient thereof. The formulations may conveniently be presented in unit dosage form and may be prepared by any method well-known in the pharmaceutical art.

All methods include the step of bringing into association the active ingredient with the carrier which constitutes one or more accessory ingredients. In general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredient with liquid carriers or finely divided solid carriers or both, and then, if necessary, shaping the product into the desired formulation.

Formulations suitable for intravenous, subcutaneous, or intraperitoneal administration conveniently comprise sterile aqueous solutions of the active ingredient with solutions which are preferably isotonic with the blood of the recipient. Such formulations may be conveniently prepared by dissolving solid active ingredient in water containing physiologically compatible substances such as sodium chloride (e.g. 0.1-2.0 M), glycine, the like, and having a buffered pH compatible with physiological conditions to produce an aqueous solution, and rendering said solution sterile. These may be presented in unit or

35

- 33 -

multi-dose containers, for example, sealed ampoules or vials.

The formulations of the present invention may incorporate a stabilizer. Illustrative stabilizers are polyethylene glycol, proteins, saccharides, amino acids, inorganic acids, and organic acids which may be used either on their own or as admixtures. These stabilizers are preferably incorporated in an amount of 0.11-10,000 parts by weight per part by weight of antibody. If two or more stabilizers are to be used, their total amount is preferably within the range specified above. These stabilizers are used in aqueous solutions at the appropriate concentration and pH. The specific osmotic pressure of such aqueous solutions is generally in the range of 0.1-3.0 osmoles, preferably in the range of 0.8-1.2. The pH of the aqueous solution is adjusted to be within the range of 5.0-9.0, preferably within the range of 6-8. In formulating the therapeutic agent of the present invention, anti-adsorption agent may be used.

Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action. Controlled release preparations may be achieved through the use of polymer to complex or absorb antibodies of the present invention or antigen-binding fragments, or their functional derivatives. The controlled delivery may be exercised by selecting appropriate macromolecules (for example polyester, polyamine acids, polyvinyl, pyrrolidone, ethylenevinylacetate, methylcellulose, carboxymethylcellulose, or protamine, sulfate) and the concentration of macromolecules as well as the methods of incorporation in order to control release. Another possible method to control the duration of action by controlled-release preparations is to incorporate the antibodies or antigen-binding fragments, or their functional derivatives, into particles of a polymeric material such as polyesters, polyamine acids, hydrogels, poly(lactic acid) or

35

- 34 -

ethylene vinylacetate copolymers. Alternatively, instead of incorporating these agents into polymeric particles, it is possible to entrap these materials in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatine-microcapsules and poly(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, or in colloidal drug delivery systems, for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles, and nanocapsules or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

When oral preparations are desired, the compositions may be combined with typical carriers, such as lactose, sucrose, starch, talc magnesium stearate, crystalline cellulose, methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, glycerin, sodium alginate or gum arabic among others.

Example 1

Production of Hybridomas and Methods For Characterizing the Antibodies

Immunization and monoclonal antibody generation. Mouse L1-2 lymphoma cells stably expressing human E-selectin cDNA (L1-2ELAM) (Picker et al., 1991 Cell 66:921-933, incorporated herein by reference) were used as the immunogen for generation of antibodies of the present invention. Briefly, L1-2ELAM cells (2×10^7) were injected i.p. into C57BL/6 mice at bi-weekly intervals (a total of 3 injections) in the absence of adjuvant. The last boost was done 4 days prior to the fusion. The SP2/0 myeloma cell line was used as a fusion partner and previously described procedures were followed in the generation of hybridomas (Kishimoto et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:224-2248, incorporated herein by reference). The SP2/0-Ag14 myeloma cell line is available from the American Type

35

- 35 -

Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA under Accession No. CRL 1581. The fusion was screened on day 10 by flow cytometry using E-selectin transfected and mock transfected L1-2 cells. A total of 279 wells were screened and 15 selected for further analysis. Secondary screens included SDS-PAGE/Western blot analysis, immunohistology, and staining of peripheral blood leukocytes. As described below, EL-246, which is a mouse IgG1, was found to stain both E-selectin transfectants and human leukocytes.

Animals. The animals used as sources of blood (see below) were randomly selected from the large animal facilities at Montana State University. Both Balb/C and C57BL/6 mouse strains were used. The mice ranged in age from 6-12 weeks and were used primarily for the generation of monoclonal antibodies or as source of lymphoid tissues. The mice were housed in the small animal facility at Montana State University which is AAALAC approved. One month old calves, housed in the MSU large animal facility, were used as sources of peripheral blood in some experiments.

Monoclonal antibodies utilized. Leu-8 (purchased from Becton Dickinson & Co., Mountainview, CA) and DREG series of mAb (DREG 56, DREG 200, and DREG 152), which are mouse IgGs that have been shown to recognize human L-selectin (Camerini et al., 1989 *Nature (London)* 342:78-80; Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2244-2248, incorporated herein by reference) were used in the flow cytometric and Western blot analysis described below. Leu-8 was used as a phycoerythrin (PE) conjugate and the DREG mAb were used as unconjugated mAb followed by appropriate second stage or as fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugates. The DREG mAbs were partially purified by ammonium sulphate precipitation. Other mAbs, DREG55 (mouse anti-L-selectin IgG1, SH43 (mouse IgG1 anti-sheep platelet, Jutila M.A. unpublished) and EL-81 (mouse IgG1 anti-ELAM-1),

- 36 -

° were used as negative controls in many of the experiments described below.

Flow cytometric analysis was performed on a FACScan® (Becton and Dickinson, Mountain View, CA) as described (Jutila et al. 1989 *Immunol.* 143:3318-3324; Kishimoto et al., 1989 *Science (Wash. D.C.)* 245:1238-124]; Jutila et al., 1990 *Cell. Immunol.* 132:201-214, incorporated herein by reference). Flow cytometric analysis was performed to verify the specificity of the EL-246 monoclonal antibody for E-selectin and L-selectin as shown by fluorescence of cells expressing E- or L-selectin and negative fluorescence of cells not expressing E- or L-selectin after treatment with EL-246. For two color analysis, PE-conjugated Leu-8 (Becton Dickinson) or a FITC-conjugated DREG Mab were used in combination with EL-246. The cells stained with second stage were treated with 10% mouse serum to block any available anti-mouse Ig binding sites and negative control mouse mAbs were used to evaluate the level of background staining. Data were collected from 10,000-50,000 cells and are presented as histograms or contour plots.

Western blot SDS-PAGE analysis. Western blot analysis was conducted to verify the specificity of the EL-246 monoclonal antibody for E-selectin and L-selectin using cell lysates from cells expressing E-selectin or L-selectin or immunoaffinity purified E-selectin or L-selectin. Positive staining by the EL-246 antibody of protein bands corresponding to the appropriate molecular weight for E-selectin and L-selectin, was indicative of a specificity for both selectins.

Lysates of human peripheral blood lymphocytes or L1-2ELAM cells suspensions were prepared by incubating 3×10^7 cells in 1.0 ml of NP-040 lysis buffer (3% NP-40, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 5mM EDTA, 0.02% NaN₃, and 10 µg/ml of the following protease inhibitors, pepstatin A, antipain,

35

- 37 -

leupeptin, chymostatin, benzamidine, and PMSF; all in 50 mM Tris-HCL pH 7.5) for 30 min on ice. Lysates were clarified by centrifugation at 10,000g for 10 min and either used for affinity purification or directly in SDS/PAGE-Western blot analysis.

- 5 For affinity isolation, CNBR-activated Sepharose 4B beads (Pharmacia) were coupled to appropriate mAb (4 mg of mAb/ml of beads) according to manufacturer's instructions (Pharmacia Fine Chemicals) using poly preparatory chromatography columns (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).
- 10 One ml of lysate containing the antigen of interest was mixed with 3 ml of wash buffer (150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1% NP40, 5 mM NaN₃, 20 mM Tris Buffer, pH 7.5), and combined with the beads described above on a rotator for 2 hr at 4°C. After the incubation, the beads were washed with 10 mls of
- 15 wash buffer to remove any unbound antigen. Bound antigen was eluted with 3 ml of elution buffer (500 mM NaCl, 0.1% NP40, 5 mM NaN₃, 200 mM acetic acid) and eluents collected in 0.5 ml fractions and neutralized with 100 µl of 1M Tris buffer, pH 8.0. Fractions containing proteins of interest
- 20 were determined by Dot-Blot analysis.

- For SDS/PAGE-Western blot analysis, crude lysates or affinity purified antigen were mixed with equal volumes of 2x nonreducing SDS-solubilization buffer, run on a 8% SDS-PAGE gel, and transferred to nitrocellulose with a
- 25 BioRad transblot apparatus per manufacturer's directions (BioRad Laboratories). Mild nondenaturing conditions were used (no boiling and most procedures done at 4°C). Filters were incubated with 50% horse serum in Tris Balanced Salt Tween TBST (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.05%
- 30 Tween-20) for 30 minutes. Using a 25 lane mini-blot apparatus (Immunonetics, Cambridge, MA), the filters were then incubated for 30 mins with either specific or negative control mouse mAb at 50 µg/ml concentrations or as culture supernatant fluid. The nitrocellulose filters were then

35

- 38 -

washed in TBST, incubated with goat anti-mouse Ig-alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical Co., A-9654), diluted 1:200; and then washed again. The blots were developed by addition of substrate solution (Promega Biotech, Madison, WI).

5 *Leukocyte cell suspensions.* Leukocytes were harvested from the peripheral blood of humans, goats, sheep, cattle, horses, pigs, rats and chickens. For routine immunofluorescence staining, RBCs (except chicken RBCs) were lysed in a hypotonic solution. Human blood was used as a
10 source of leukocytes for the functional assays described below. Previously described methods were used to isolate both mononuclear cells and neutrophils (Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:244-2248; Jutila et al., 1989 *Immunol.* 143:3318-3324; Kishimoto et al., 1989 *Science*
15 (*Wash. D.C.*) 245:1238-1241; Jutila et al., 1990 *Cell. Immunol.* 132:201-214, incorporated herein by reference). Briefly, blood was collected into citrate anti-coagulant tubes, diluted 1:2 with warm Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), underlayered with Histopaque 1077, and centrifuged at
20 2,300 RPM for 30 min at room temperature. Mononuclear cells were collected from the Histopaque/plasma interface. The pellet, which includes RBCs and neutrophils was resuspended to its original volume in HBSS and the neutrophils isolated by Dextran sedimentation. Residual RBCs in both the
25 mononuclear cell and neutrophil preparations were lysed by hypotonic treatment.

Immunofluorescence staining. Immunofluorescence staining of leukocytes was carried out as described (Jutila et al., 1989 *Immunol.* 143:3318-3324; Koshimoto et al., 1989
30 *Science (Wash., D.C.)* 245:1238-1241; Jutila et al., 1990 *Cell. Immunol.* 132:201-214; Stamper et al., 1976 *J. Exp. Med.* 144:828). Briefly, 1×10^6 cells were initially incubated in 2% rabbit serum for 10 minutes on ice to block Fc receptors. The cells were washed and then incubated with

35

- 39 -

primary antibody at 50 ug/ml (or undiluted culture supernatant) for 20 minutes on ice. After washing, bound antibodies were revealed by incubation with PE or FITC conjugated F(ab)'2 goat anti-mouse Ig (Tago Inc., Burlingame, CA) at a 1:80 dilution in 5% FBS in DMEM.

5 *Immunoperoxidase staining.* Acetone-fixed 6 μ m frozen sections of tonsils were incubated with antibodies in phosphate buffered saline (PBS) (50 μ g/ml) for 30 minutes at room temperature in a humidified chamber, and then washed in PBS. Using a TAGO histochemical kit (Histoprobe, TAGO, 10 Burlingame, CA), a 3 stage immunoperoxidase stain using an avidin biotin system was done per manufacture's instructions,. Sections were lightly counterstained with hematoxylin.

15 *In vitro PMA treatment of peripheral blood leukocytes.* Isolated peripheral blood mononuclear cells from the animals listed above were incubated with phorbol myristate acetate (PMA) (10 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO) for 20 minutes at 37°C in HBSS. After the incubation period, the cells were washed, and then stained for flow cytometric 20 analysis.

Example 2

EL-246 recognition of human E-selectin

EL-246 was initially screened on human E-selectin 25 cDNA transfected mouse L1-2 cells by flow cytometry and SDS PAGE/Western blot. As shown in Figure 1, E-selectin transfected, but not the mock transfected L1-2 cells, stained brightly with EL-246 in flow cytometric analysis indicating a specificity of the antibody for E-selectin. 30 The arrows point to histograms which represent (1) EL-246 staining of L1-2ELAM (2) L1-2 transfectant negative controls, and (3) background staining (second stage control) of the L1-2ELAM transfectants. The molecular weight of the antigen expressed by the transfectants recognized by EL-246

35

- 40 -

was approximately 110kD under nonreducing SDS PAGE/Western blot (Figure 2) which is the appropriate molecular weight for E-selectin. L1-2ELAM NP40 lysate was run on a nonreducing 8% SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose. The blots were probed with EL-81 (anti-E-selectin, lane 3), EL-246 (lane 2), and negative control antibody (lane 1). The distance of migration of the molecular weight markers were as indicated. EL-246 also recognized E-selectin cDNA transfected L-cells, but did not recognize P-selectin cDNA transfected cells as shown by flow cytometry and Western blots. As an additional means of showing the reactivity of EL-246 with E-selectin, sections of inflamed tonsil tissue were stained for immunohistological analysis. As shown in Figure 3, EL-246 stained venules (E-selectin) in inflamed human tonsil. Frozen sections of human tonsil were prepared as described in Example 1 and stained by immunoperoxidase with EL-246 (Magnification, 400x). Therefore, using accepted biochemical and molecular criteria EL-246 clearly recognized human E-selectin.

20

Example 3

EL-246 recognition of human L-selectin

Flow cytometric analysis showed that EL-246 also stained human peripheral blood leukocytes. The leukocyte surface antigen is down-regulated after treatment with PMA (Figure 4). Human peripheral blood leukocytes were isolated as described in Example 1 and stained with EL-246 for flow cytometric analysis. The expression of the EL-246 antigen on neutrophils and lymphocytes, which were identified by their distinctive forward and side light scatter profiles, is shown in the representative histograms. A comparison of the staining before (untreated; Figure 4A) and 20 minutes after PMA activation (PMA-treated; Figure 4B) is shown. Background fluorescence with an isotype control or second stage alone gave a mode fluorescence value of < 10 in each

35

- 41 -

analysis. All circulating human neutrophils expressed the EL-246 antigen, whereas, variable numbers of lymphocytes were positive, which is the same distribution pattern described for L-selectin (Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:244-2248; Kansas et al. 1985 *J. Immunol.* 134:2995). In two color flow cytometry, all EL-246 positive cells were shown to be DREG 56 (anti-L-selectin mAb (Kishimoto, et. 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:224-2248) positive and the staining patterns of the two antibodies were similar (Figure 5). Two color flow cytometric staining was done using FITC-labeled DREG 56 (anti-L-selectin mAb (29) and EL-246 as described in Example 1. A contour plot is shown with demonstrates that all EL-246 cells are also L-selectin positive. The human leukocyte EL-246 antigen was lost from the cell surface after activation of neutrophils and lymphocytes with PMA (Figure 4B and 4D, respectively), which is also characteristic of L-selectin. Cells transfected with human L-selectin cDNA, but not the transfectant controls, were specifically stained with EL-246 (see below). Finally, the reactivity of EL-246 was also confirmed at the protein level, since immuno-affinity purified L-selectin was recognized by EL-246 mAb in Western blots (Figure 6-Lane 2). Therefore, by accepted biochemical and molecular criteria EL-246 also reacted with L-selectin.

25

Example 4

The EL-246 epitope is expressed on selectins from a variety of different animals

To evaluate the level of evolutionary conservation of the EL-246 epitope peripheral blood cells from a variety of different animals were screened for EL-246 staining by flow cytometry. As shown in Table 1, EL-246 stained leukocytes isolated from humans, goats, sheep, cattle, and pigs. Chicken and rat leukocytes were EL-246 negative by

35

- 42 -

° flow cytometric analysis, which was also confirmed by lack
of staining of cytopsin preparations. The antigen
recognized by EL-246 in these other animals had the
characteristic distribution of L-selectin, with lymphocytes
exhibiting a bi-modal distribution, and its surface
5 expression lost after the cells were treated with PMA.

10

15

20

25

30

35

- 43 -

TABLE 1

EL-246 recognizes L-selectin in
a variety of different animals

Animals	Reactivity with L-selectin on PBL ^a	
	EL-246 mAb	DREG 56 mAb
5 Human	+++	+
Sheep	+++	-
Goats	++	-
Cattle	+++	+
Pigs	++	-
Horses	-	-
Rats	-	-
10 Chickens	-	-

^aPBL = Peripheral blood lymphocytes

Example 5

EL-246 blocks the function of
both L-selectin and E-selectin

15

The ability of EL-246 to block E- and L-selectin function was tested. The function universally attributed to L-selectin is the adhesion of lymphocytes to high endothelial venule (HEV) cells in peripheral lymph nodes (Rosen, 1990 *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 3:397-402; Berg et al., 1989 *Immunol. Rev.* 108:5-18). The Stamper-Woodruff assay is an ex vivo assay that is accepted by those skilled in the art as replicative of adhesive interactions between lymphocytes and the endothelium of lymphoid organs in vivo (Lasky, L.A. 1992 Chapter 3, In: *Adhesion. Its Role In Inflammatory Disease* J.M. Harlam and DY Liu (eds.) W.H. Freeman and Company, NY, pp. 43-63). In this assay, frozen sections of various lymphoid organs are incubated with lymphocytes, the sections washed, and the degree of specific binding between the added lymphocytes and specialized high wall endothelium of the post capillary venules of these organs determined.

20

25

30

Using the Stamper and Woodruff ex vivo frozen section binding assay (Stamper et al. 1976, *J. Exp. Med.*

35

- 44 -

144:828), it was found that EL-246 blocked lymphocyte adhesion to peripheral lymph node high endothelial venules equally as well or perhaps better than our previous blocking anti-L-selectin mAb, DREG 56 ($95.6 \pm 4.8\%$ versus $88 \pm 5.1\%$ blocking, respectively) (Figure 7). Human lymphocytes were
5 treated with EL-246, DREG56, or an isotype matched negative control (EL-81) for 20 minutes on ice and the effect on binding to peripheral lymph node HEV determined. Control mAb, including some generated in the same fusion which yielded EL-246, had no effect on lymphocyte-HEV binding
10 (Figure 7). EL-246 did not significantly block the binding of FITC-PPME to human lymphocytes, another function mediated by L-selectin (Rosen, 1990 *Am. J. Respir. Cell. Mol. Bio.* 3:397-402). These results are similar to the blocking activity of mAb directed to the EGF domain of L-selectin
15 (Kansas et al., 1991 *J. Cell. Biol.* 114:351-358; Siegeleman et al., 1989 *Cell* 61:611-622).

To examine the effect of EL-246 on E-selectin function, the ability of neutrophils to bind L-cells stably expressing E-selectin was tested. In this binding assay the
20 adhesion of neutrophils to the transfectants is clearly E-selectin-dependent (Kishimoto et al., 1990 *Blood* 78,805-811). The transfectants were treated with EL-246 for 30 minutes and washed prior to addition of purified human neutrophils. Fc receptors were saturated by pretreating the
25 neutrophils with 10% RBS for 20 minutes prior to the assay. As shown in Figure 7B, EL-246 nearly completely blocked the binding of neutrophils to the transfectants (90%), whereas another mAb (EL-81) (isotype negative control), which recognizes E-selectin, had little effect on binding.
30 Likewise, treatment of the E-selectin transfectants with an anti-L-selectin specific mAb (DREG 56) also had no effect on binding (Figure 7). Values were recorded as percentage of control cell binding, where controls cells were incubated in assay medium alone. The experiments were repeated 3x and

35

- 45 -

the means \pm sem are presented. Therefore, EL-246 is an effective blocker of E-selectin function.

Neutrophil-E-selectin transfectant binding assay.

L-cells stably expressing human E-selectin cDNA (80% ELAM-1 positive determined by flow cytometry), previously described in Kishimoto et al., 1990 *Blood* 78:805-811, were grown on plastic 8-well Lab Tek slides (Miles Scientific). Neutrophils isolated from human peripheral blood were resuspended at 1×10^6 cells/ml in CRPMI, and 400 μ l added to the wells of the transfected L-cell cultures. The neutrophils were allowed to adhere at room temperature for 15 minutes under constant rotation, as previously described (Kishimoto et al., 1990 *Blood* 78:805-811). After the incubation, the medium in each well was aspirated, slide chambers removed, and the slides placed in a coplin jar with 1.0% glutaraldehyde in HBSS. Adhesion was measured by counting the number of neutrophils/L-cell. The effect of mAb treatment of the L-cells was determined as follows. In all experiments the neutrophils were pre-coated with 10% rabbit serum to block available Fc binding sites. The E-selectin transfectants were treated with EL-246 (culture supernatant or 50 μ g/ml purified antibody), DREG56 or an isotype negative control mAb for 20 minutes on ice, washed, and then used in the adhesion assay.

Peripheral lymph node HEV Assay. The *in vitro* assay of lymphocyte binding to HEVs in frozen sections (Stamper et al., 1976 *J. Exp. Med.* 144:828) has been extensively described (recently reviewed in Berg et al., 1989 *Immunol, Rev.* 108:5). It has previously been shown that HEV in mouse peripheral lymph nodes bind human lymphocytes well, and this binding is dependent upon L-selectin (Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2244-2248). Purified human lymphocytes were incubated with EL-246, a blocking anti-L-selectin mAb (DREG 56), or different isotype controls and the effect on adhesion to

- 46 -

peripheral lymph node HEV determined. Cell binding was quantified by first identifying HEVs in each field by their characteristic autofluorescence or unique plump morphology, then counting cells bound to HEV, as described (Kishimoto et al., 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 87:2244-2248, incorporated herein by reference). Data were calculated as number of cells bound per individually scored HEV. For each data point, 150 HEVs in >3 sections were counted, and represent 4 independent experiments. Values are presented as percentage of medium control.

10

Example 6

Mapping of the EL-246 epitope to the SCR domains

Domain mapping of the EL-246 epitope. The epitope defined by the EL-246 mAb was localized using L-selectin/P-selectin chimeras as described by (Kansas et al., 1991 *J. Cell. Bio.* 114:351-358, incorporated herein by reference). Stable transfectants of the 300.19 mouse pre-B cell line (Alt et al., 1981 *Cell.* 27:381) expressing either native L-selectin; L2P, which contains the lectin domain from L-selectin and the remainder of the protein from P-selectin; or L2P3L, in which only the EGF domain of P-selectin has been substituted for that of L-selectin, were produced as described elsewhere (Kansas et al, manuscript in preparation). 5×10^5 cells of each type were incubated on ice for fifteen minutes in 100 μ L of culture supernatants or PBS/1% FCS containing diluted ascites of the indicated mAb, washed, and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (TAGO, Burlingame, CA). The cells were then washed and analyzed by flow cytometry on an EPICS Profile (Coulter Immunology, Hialeah, FL).

25
30

The pattern of binding of EL-246 mAb to L-selectin/P-selectin chimeras was used to determine the domain of L-selectin in which the EL-246 epitope resides. As controls, the LAM1-3 (Coulter), LAM1-1, and LAM1-14 mAb,

35

- 47 -

which define epitopes within the lectin, EGF and SCR domains of L-selectin, respectively (Kansas et al., 1991 *J. Cell. Biol.* 114:351-358; Spertini et al., 1991 *J. Immunol.* 147:942), and the AC1.2 mAb (Hsu-Lin et al., 1984 *J. Biol. Chem.* 259:9121), which identifies an epitope in the SCR domains of P-selectin (Rosen, 1990 *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 3:397-402) were used. EL-246 specifically recognized native L-selectin, but not L2P, which contains only the lectin domain from L-selectin (Figure 8). Analysis was carried out by flow cytometry as described in Example 1. The EL-246 epitope is therefore not within the lectin domain of L-selectin. In addition, EL-246 recognized L2P3L, in which only the EGF domain of L-selectin has been replaced by that of P-selectin. Therefore, EL-246 recognizes only those selectins containing the SCR domains of L-selectin. These data indicate that at least part of the EL-246 epitope is within or requires the SCR domains of L-selectin.

Additional data in support of these results are that EL-246 does not block the lectin activity of L-selectin or cross-block the binding of four mAbs (DREG 200, DREG 55, DREG 56, and Leu-8) that recognize the L-selectin domain.

Example 7

Method of Inhibiting L-selectin Dependent Leukocyte Migration

The methods for using antibodies or antigen binding fragments of the present invention for inhibiting L-selectin dependent leukocyte migration is described by Jutila et al., 1989 *J. Immunol.* 143:3318, incorporated herein by reference).

Two methods for demonstrating antibodies in inhibiting inflammatory neutrophil homing in vivo may be used. The first is a modification of the method of Rosen and Gordon (1987 *J. Exp. Med.* 166:1685). Mice are injected i.v. with 500 μ g of the various antibodies or saline alone

35

- 48 -

1 h before the induction of inflammation in the peritoneal cavity with 1 ml of thioglycollate broth. Three hours later, the peritoneal cavities of the mice are washed out with 10 ml of HBSS and the number of newly arrived peritoneal neutrophils are evaluated for each animal. Peripheral blood is also collected from each animal, RBCs are lysed, and the effect of the antibody treatment of circulating neutrophils is quantified. The percentage of neutrophils in the peritoneum and peripheral blood of each animal is determined by FMF analysis after staining with the neutrophil antibody RB6-8C5 and by Wright's stain differentials. FMF analysis is performed on a FACS Star® or FACScan® (Becton Dickinson, Mountain View, CA) as described in Jutila et al., 1988 *Eur. J. Immunol.* 18:1819. Antibody blocking data are presented as percent of medium control.

The second approach is the method used by Lewisohn et al. (1987 *J. Immunol.* 138:4313). Bone marrow neutrophils are labeled with FITC (Sigma), as previously described (Butcher et al., *Handbook in Exp. Immunol.* 57.1-57.3), and then 2 to 5 x 10⁷ cells are injected i.v. into mice which received 1 to 2 ml of thioglycollate broth i.p. 3h earlier. The FITC-labeled bone marrow neutrophils localize effectively to sites of inflammation *in vivo* (Lewisohn et al., 1987 *J. Immunol.* 138:4313). The cells that accumulate in the inflamed peritoneal cavity are revealed by FMF analysis of 50,000 cells. Data are recorded as the percentage of FITC-labeled donor neutrophils vs unlabeled host neutrophils in the inflamed peritoneal cavity. The unlabeled host neutrophils serve as a standard for the level of inflammation in a given animal. Routinely, the percentage of FITC-labeled neutrophils that accumulate in the inflamed peritoneum ranges from 2 to 8%. For blocking studies, FITC-labeled neutrophils are precoated with the antibodies of the present invention at saturating concentrations for 20 to 30 min on ice. The cells are

35

- 49 -

° washed and the are injected into animals that receive thioglycollate 3 h earlier. FMF analysis of 50,000 cells isolated from the peritoneal cavity of each mouse is performed. Clearance of antibody-coated cells is evaluated by examining peripheral blood levels from each test animal.
5 The percentage of FITC-labeled neutrophils vs unlabeled host neutrophils in the peritoneum and the blood of each animal is determined. The data after antibody treatment are presented as a percentage of medium control. The specificity of antibody blocking is determined by
10 calculating a SER for each animal by dividing the percent FITC-labeled neutrophils in the peritoneum by the percent FITC-labeled neutrophils in the peripheral blood. (SER=FITC neutrophils/host neutrophils peritoneal/(FITC neutrophils/host neutrophils) blood. If neutrophil
15 localization at the inflammatory site is blocked due to clearance of the antibody coated cells from the circulation, this results in SER values similar to saline control.

Example 8

20 *Method of Screening Antibodies Useful For Prevention and Treatment of Alveolar and Dermal Inflammation*

The method for demonstrating the effectiveness of the antibodies or antigen binding fragments of the present invention in the prevention or treatment of alveolar and
25 dermal inflammation is described in Mulligan et al. (1991 J. Clin Invest 88:1396-1406, incorporated herein by reference).

Monoclonal antibodies. Antibodies directed against L-selectin and E-selectin are generated as described
30 in Example 1.

The control (non-selectin binding) monoclonal antibody consists of F(ab')₂ fragments derived from pepsin digestion. For the immune complex studies of lung and dermal vascular injury, a total of 135 µg antibodies of the
35

- 50 -

present invention or control F(ab')₂ are injected intravenously in three equally divided doses at 2.5, 3.0, and 3.5 h after intravenous injection of bovine serum albumin (BSA) and intratracheal instillation or intradermal injection of anti-BSA (which consists of rabbit polyclonal IgG rich in antibody to bovine serum albumin). Negative control animals are not injected with BSA.

Animal models of immune complex alveolitis and dermal vasculitis. Rabbit polyclonal IgG rich in anti-BSA is used to induce lung and dermal vascular injury (Johnson & Ward, 1981 *J. Immunol.* 126:2365). IgG is purchased from Organon Teknika, West Chester, PA. The IgG anti-BSA and BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) preparations that are used for injection into rats contained 20 pg/ml and 12 pg/ml of endotoxin activity, respectively, as measured by the limulus amebocyte lysate assay (E-toxate, Sigma Chemical Co.). 300-350 g male Long-Evans specific pathogen-free rats (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, MA) are used for all studies. Intraperitoneal ketamine (25-50 mg/100 g body wt) and sodium pentobarbital (5 mg/100 g body wt) are administered for sedation and anesthesia. Immune complex lung injury is induced by the intravenous injection of 100 mg BSA (in 1.0 ml saline) and the intratracheal instillation of anti-BSA in 300 μ l. The following intratracheal doses of anti-BSA are used: 0.75 mg, 1.50 mg, 2.50 mg, or 3.33 mg. Rats are killed 4 h after injury and the pulmonary circulation was flushed with 10 ml saline via pulmonary arterial injection. Permeability indices, as a measure of lung injury, are determined by comparing leakages of ¹²⁵I-labeled albumin into parenchyma to the amount remaining in 1.0 ml of blood.

Reversed passive dermal Arthus reactions are induced by intradermal injection of 0.10-0.84 mg anti-BSA contained in a volume of 0.10 ml, followed by intravenous injection of 10 mg BSA in 1.0 ml saline. Rats are killed 4

35

- 51 -

h thereafter and permeability indices calculated by measuring the ratio of radioactivity present in full thickness skin biopsies compared to radioactivity present in 1.0 ml of blood. Negative controls include animals with intradermal sites injected with anti-BSA but with the omission of intravenous injection of BSA.

For assessment of lung or dermal hemorrhage, red blood cells (RBC) are harvested from heparinized blood obtained from normal adult Long-Evans rats. Nine ml of blood is diluted with 40 ml of saline containing 1:1,000 (wt/wt) heparin. To this is added 100 μCi ^{51}Cr , followed by incubation for 1 h at 37°C with continuous shaking. After centrifugation at 1,000 rpm (at 4°C) for 6 min, cells are washed in PBS three times and are then ready for use. Animals are injected with ^{51}Cr -labeled RBC (45 μL containing 80,000, CCiD) 1/2 h before injection of BSA and anti-BSA. At the time of killing, skin sites and saline-perfused lungs are measured for ^{51}Cr radioactivity and compared to counts present in 1.0 ml. of blood. At the conclusion of each experiment, blood samples from each animal are centrifuged and radioactivity measured in the cells and serum. The same injury and treatment protocols are used as described above for immune complex-induced lung and skin injury.

Glycogen-induced peritoneal exudates. Neutrophil-rich exudates are elicited in rat peritoneal cavities with the injection of 25 ml 0.1% (wt/vol) oyster glycogen 4 h before killing. 135 μg F(ab')₂ fragments of the present invention are injected intravenously in three equally divided doses in the treatment group (at 2.5, 3.0, and 3.5 h) to assess effects on neutrophil recruitment into peritoneal cavities.

Tissue myeloperoxidase (MPO) content. A standard reference curve is first established by measuring MPO in lungs and skin sites that have been injected with known numbers of neutrophils. Lung and skin sites are extracted

35

- 52 -

by homogenization and sonication procedures that have been previously described (Warren et al., 1989 *J. Clin. Invest.* 84: 1873). MPO activity in supernatants is measured by the change of optical density (at 460 nm) resulting from decomposition at H_2O_2 in the presence of o-dianisidine.

- 5 *Immunohistochemical analysis of cells and lung tissue.* Monolayers of rat pulmonary artery endothelial cells (RPAEC) on plastic sides are stimulated with 50 ng/ml human recombinant $TNF\alpha$ for 4h, washed with PBS, and fixed with acetone. Slides containing monolayers of stimulated
10 and unstimulated cells are then incubated with antibodies of the present invention (1.0 ng/ml) for 45 min. The slides are then washed with PBS and then stained for bound mAb using biotin/avidin-peroxidase system for mouse IgG (Vectastain; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).
15 After hematoxylin counterstaining, sections are coated with aqua-mount (Lerner Laboratories, Pittsburgh, PA) and are examined by light microscopy for the presence of reaction products of peroxidase. Immune complex-induced lung injury is accomplished using the same protocols described above.
20 Animals are killed at 0, 1, 2, 3, and 4 h. The lungs are inflated with 8-9 ml of optimal cutting temperature (OCT) compound (Miles Laboratories Inc., Elkhart, IN) and frozen sections obtained from lungs of normal rats and those undergoing intraalveolar deposition of immune complexes.
25 After mounting on poly-L-lysine coated slides and fixation with acetone, tissue sections are then reacted with antibodies of the present invention, as described above.

To assess whether $TNF\alpha$ -stimulated HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) removes antibody reactivity, an additional experiment is also carried out using the same staining procedure, and using lung from the
30 4 h immune complex reaction. Before use, the mAb preparation of the present invention (1.0 ng/ml) is incubated for 1 h at 27°C with monolayers (5×10^6 cells) of

35

- 53 -

- ° TNF α - (50 ng/ml) -stimulated or unstimulated HUVEC, preceding application of antibody to the lung sections.

Morphologic evaluation of lungs and skin. Lungs are fixed in 10% phosphate buffered formalin for subsequent hematoxylin and eosin staining and examination by light
5 microscopy. Skin samples are similarly treated.

Neutrophil-mediated cytotoxicity of endothelial cells. Neutrophil-mediated cytotoxicity of RPAEC is measured by a standard ^{51}Cr release assay (Varani et al., 1985 *Lab. Invest.* 53:656). RPAEC are seeded into wells of
10 a 24-well culture dish, with 5×10^4 cells per well in 1 ml culture medium. Each well receives 2 μCi of $\text{Na } ^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) and the monolayers are then incubated for 14 h. TNF α is then added at a concentration of 50 ng/ml and the monolayers are incubated for an
15 additional 4 h. The plates are then washed twice with HBSS (Hank's balanced salt solution) containing 0.02% BSA to remove the non-incorporated radioactivity. The endothelial cell monolayers are then ready for use. When antibodies are employed, they are added to the monolayers and are
20 incubated for 30 min. Human blood neutrophils are isolated and suspended in HBSS supplemented with 0.02% BSA. After incubation with Ab, neutrophils are then added to duplicate wells to give effector to target cell ratios of 30:1 in a final volume of 1.0 ml. Neutrophils are allowed to settle
25 onto the endothelial cell monolayers for 30 min before the addition of phorbol myristate acetate (PMA) (50 ng/ml) which is added in a volume of 0.1 ml per well. After an additional incubation of 37°C for 6 h, 0.9 ml supernatant is removed from each well and any cells in suspensions removed
30 by centrifugation. The supernatant fluid (0.5 ml) is aspirated and assayed in a γ -scintillation counter to determine ^{51}Cr release.

35

- 54 -

*Example 9**Method For Prevention and Treatment of Asthma*

The method for demonstrating the effectiveness of the antibodies or antigen binding fragments of the present invention in the treatment of asthma is described in U.S. Serial No. 738,633 and in Gundel et al., 1991 *J. Clin. Invest.* 88:1407-1411, both incorporated herein by reference.

Animals: The animals are wild-caught adult male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) weighing approximately 4 to 8 kg (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Primate Imports, Port Washington, N.Y.).

Monoclonal Antibody: Stock solutions of antibodies are diluted with saline (final concentration 2 mg/ml) immediately before intravenous injections into a peripheral leg vein. Antibodies or antigen binding fragment treatment are administered 1 hour before antigen inhalation challenge. Antibody specific for ELAM-1 alone, may be used as a positive control. Antibody against ELAM-1 (CL2) was generated as described in Picker et al., *Nature* 349:796 (1991).

Rrs Measurements: Respiratory system impedance (Rrs) is measured by discrete frequency (4-40 Hz in 11 equal logarithmic steps) sinusoidal forced oscillations superimposed on tidal breathing as described in Wegner et al., 1984 *Respir. Physiol.* 55:47. The mean of the real or in-phase component of Rrs over the entire frequency is then computed to provide a single value representation of Rrs.

Bronchoalveolar lavage (BAL): BAL is performed by guiding a fiberoptic bronchoscope (Olympus Optical, model 3C-10, Lake Success, N.Y.) past the carina and is wedged into a 5th to 7th generation bronchus. A 15 ml aliquot of bicarbonate buffered saline (pH 7.4, 23°C) is infused and gently aspirated through a channel in the bronchoscope. Collected samples are centrifuged at 2000 RPM for 10 minutes and the resulting cell pellets are resuspended in Ca⁺⁺ and

35

- 55 -

° Mg⁺⁺ free Hank's balanced salt solution. It has been shown that the BAL procedure will elicit a mild inflammatory response. Thus, to avoid the possible effects of BAL on lung cellular composition, BAL is performed alternating the right and left lungs before and after antigen challenge.
5 The return volume of infused buffer is very constant throughout the study and the procedure is well tolerated by the animals. Total white cell counts are obtained using a Coulter counter (Coulter Electronics, model #10, Hialeah, FL).

10 *Antigen Inhalation Challenge:* Antigen inhalation challenges are administered by intermittent positive pressure breathing with a Bird 7A respirator and micronebulizer (Bird Corporation, model #8158). Each challenge consisted of 15 breaths per minute (maximum
15 inspiratory pressure of 20 cmH₂O) for 2 minutes. *Ascaris summ* extract (Greer Laboratories, Lenoir, NC) is diluted with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to the appropriate concentration for each animal (dose required to cause a 200-500% increase in Rrs during the immediate
20 response). Antigen challenges are separated by 14 days for each animal. Each animal is fasted for 18 hours prior to the day of study.

Histochemistry: BAL cells are evaluated using cytocentrifuge preparations stained with Diff-Quick stain
25 (Fisher Scientific, St. Louis, MO). Differential cell counts are determined by counting 200 cells and the percentage of each cell type is recorded.

Histology: Lung biopsy samples are obtained prior to antigen challenge and during the peak late-phase response
30 with biopsy forceps and the fiberoptic bronchoscope. Immunohistochemical staining for identification of E- or L-selectin on pulmonary vascular endothelium and airway epithelium are performed as described in Wegner et al., 1990 *Science* 247:456.

35

- 56 -

Statistical Analysis: Data are analyzed statistically using two-way analysis of variance and Friedman's multiple range test.

Study Protocol: Each animal is anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (4 mg/kg; Ketaset, Myoderm Medical Supply, Norristown, PA) and xylazine (1 mg/kg/ Rompun, Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) intubated with a cuffed endotracheal tube and placed in the supine position. Ketamine (4 mg/kg, i.m.) is used as supplemental anesthesia as needed. Each animal then receives a bolus intravenous injection of monoclonal antibody or vehicle (saline). Airway cellular composition is then evaluated by performing bronchoalveolar lavage (BAL) with a pediatric fiberoptic bronchoscope after which the animals are seated in the upright position in a specially designed support chair. Baseline respiratory system resistance (Rrs) is monitored for approximately 15 minutes followed by an inhaled antigen challenge (1 hr. post i.v. treatment). Rrs is monitored continuously for 1 hour after which the animals are allowed to recover from anesthesia and returned to their cages. Rrs is monitored over a 15 minute time period, at 4, 6, 8 and 10 hours after antigen inhalation. Following a recovery period, the late-phase response is assessed by performing BAL (opposite lung lavaged prior to antigen challenge).

The study is designed such that bracketing control experiments (vehicle treatment) are performed on each animal such that each animal serves as its own control. Each study is separated by 14 days.

Pretreatment with antibodies or antigen binding fragments of the present invention 1 hour before antigen inhalation significantly attenuates both the total leukocyte infiltration and the number of infiltrating neutrophils in all animals. Treatment with antibodies or antigen binding fragments for the present invention results in a significant

35

- 57 -

reduction in late-phase bronchoconstriction but has no apparent effect on the acute response.

Example 10

Method for Detecting L- and E-selectin Bearing Cells in Biological Samples

5 *Biologicals.* A membrane-bound adhesion molecules can be genetically engineered by those skilled in the art based on the nucleotide sequence (Marlin et al 1990 *Nature* 344:70-72, incorporated herein by reference). The complete
10 nucleotide sequence for E-selectin (Bevilacqua et al., 1989 *Science* 243:1160-1165, incorporated herein by reference) and L-selectin (Bowen et al., 1989, *J. Cell Biol.* 109:421-427; Siegelman et al., 1989 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86: 5562-
15 5566; Tedder et al., *J. Exp. Med.* 170:123-133, incorporated herein by reference) are reported in the literature. The sequence containing the coding sequence plus the transmembrane and cytoplasmic domains can be amplified by
20 PCR, as described in Mullis U.S. Patent No. 4,683,195. The gene for E- or L-selectin is subcloned into one of the many available eucaryotic or procaryotic expression vectors and expressed in an appropriate host cell line.

For use as standards in immunoassays such as ELISA Western Blot, and Dot-Blot, known amounts of L-selectin and E-selectin bearing cells or cell lysates are serially
25 diluted in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) containing 1% BSA (BSA-DPBS).

Monoclonal antibody preparation. Mouse anti-L/E selectin antibodies are prepared as previously described in
Example 1.

30 *Preparation of test samples.* Human peripheral blood from a test animal is collected in heparinized vials, and PBMC (peripheral blood mononuclear cells) are isolated by using Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Thrice-washed PBMC are then resuspended in complete medium as a 5%
35

- 58 -

cell suspension. Two milliliters of the cell suspension are added to appropriate wells of a 24-well flat-bottom plates. At appropriate times, wells from each donor are collected. The cell supernate is centrifuged for 5 min at 5600 x g to remove any particulates and the cell supernate is frozen at 20°C until all samples are collected for analysis by ELISA. The supernates are thawed, cleared by centrifugation at 10,000 x g for 5 min, and then concentrated eight-fold on Centricon 30 devices as per the manufacturers instructions (Amicon, Beverley, MA). The concentrated samples are then immediately assayed for E- or L-selectin by ELISA.

ELISA for L-selectin and E-selectin bearing cells.

Antibody of the present invention in DPBS is added to 96 well flat bottom EIA microliter plates (Linbro) at 50 µl/well at room temperature for 1 h. Wells are washed three times with DPBS and then are blocked with 200 µl of 2% BSA-DPBS for 1 h at 37°C. Wells are flicked empty and a titration of L-selectin & E-selectin standards (twofold serial dilutions, 8-1024 ng/ml) and test samples, suspected of containing L-and/or E-selectin bearing cells, (diluted in 1% BSA-DPBS) are added (50 µl/well) in triplicate for 1 h at 37°C. Wells are washed three times with DPBS. The biotinylated anti L/E-selectin (EL-246) mAb is added at 2 µg/ml (50 µl/well) for 30 min at 37°C. Wells are washed three times with DPBS. An aliquot of 50 µl/well of horseradish peroxidase streptavidin (1:4000) (Zymed, San Francisco, CA) is added for 30 min at 37°C. Wells are washed three times with DPBS and once with ABTS substrate buffer (Zymed). ABTS substrate buffer is added (50 µl/well) and the plates are read on a Dynatech Microliter ELISA reader (410 nm) until maximum OD reading are obtained. Mean OD readings are calculated.

- 59 -

*Example 11**Immunoaffinity Purification of
L- and E-selectin Bearing Cells*

The present invention can be useful in combination with gene therapy techniques known in the art in the treatment of genetic disease, CD11/CD18 deficiency. The leukocytes with lack functional CD11 and CD 18 genes, bear the cell surface receptor, L-selectin and/or E-selectin. The mAbs of the present invention are bound to a solid support which is used as an affinity column. The affinity column specifically binds L-selectin and/or E-selectin bearing cells from a source such as patient's blood thus allowing for their purification or separation from other cells. Such cells, once purified, undergo gene therapy with a DNA vector carrying the CD11 and CD18 genes, and then are re-infused into the patient, thereby establishing a functioning adhesion pathway.

Example 12

*EL-246 treatment of neutrophils alone blocks
their ability to bind E-selectin cDNA transfectants.*

Pretreatment of E-selectin cDNA transfected fibroblasts with EL-246 blocks the ability of the transfectants to bind neutrophils. Since endothelial cell E-selectin and neutrophil L-selectin may potentially serve as receptor-counter-receptor pairs (Kishimoto, TK et al. 1990. Blood 78:805; Picker LJ 1991 Cell 66:921), inhibition of neutrophil binding to E-selectin was examined by only treating the neutrophil. Peripheral blood neutrophils were incubated with saturating levels of E-246 on ice for 20 min, washed, and then added to cultures of mouse L-cells transfected with human E-selectin cDNA. The effect of EL-246 on binding was evaluated and compared with an anti-L-selectin mAb (DREG 56) and 2 isotype negative control mAbs, anti-T200 and EL-81 which stain leukocyte and E-selectin,

35

- 60 -

respectively. Neutrophils were treated with the indicated antibodies at 50 ug/ml concentrations for 20 min on ice, washed, and then added to the E-selectin transfectants. The binding assay was done as described. The effect of the antibody treatments were quantified and recorded as percent of control (untreated) cell binding. Values represent means \pm s.d. of 8 values from 2 separate experiments. As shown in Figure 9, EL-246 blocked adhesion by 64%, DREG 56 inhibited by 53%, and the negative control mAbs had little effect. These results show that EL-246 treatment of neutrophils blocks their ability to bind E-selectin transfectants.

Tests were conducted to determine whether EL-246 could be found on the surface of the E-selectin transfectants after the binding assay by addition of FITC-labeled anti-mouse second stage antibody to the cells, followed by flow cytometric analysis. The neutrophils used in the experiments were pretreated with EL-246, washed and then were analyzed for the presence of EL-246 on their cell surface before and after the assay by addition of FITC-labeled anti-mouse Ig second stage antibody followed by flow cytometry. The E-selectin transfectants were similarly analyzed. The level of EL-246 on the surface of the neutrophil before and after the assay was compared. The neutrophils were saturated with EL-246 at the beginning of the assay (Figure 10A), however, no antibody could be detected on their cell surface after a 15 min co-incubation with the E-selectin transfectants (Figure 10B). Since L-selectin can be shed from the surface of leukocytes (Kishimoto, T.K. et al. 1989 Science 245:1238), tests were conducted to determine whether the loss of EL-246 antibody on the neutrophil during the binding assay was due to shedding of the molecule. Neutrophils that no longer had EL-246 on their cell surface after the assay (Figure 10B) stained brightly with a second anti-L-selectin mAb (DREG56)

35

- 61 -

that recognizes an epitope distinct from the one bound by EL-246 (Figure 10C). This indicates that shedding of L-selectin had not occurred on the EL-246 treated neutrophils.

In contrast to the lack of EL-246 on neutrophils after the assay, high levels of EL-246 were detected on the surface of the E-selectin transfectants (Figure 10E). Transfectants that did not receive EL-246-treated neutrophils did not react with the second stage (Figure 10D). The level of fluorescence intensity of the transfectants exposed to EL-246 treated neutrophils, followed by second stage antibody (Figure 10E), was the same or slightly higher than the level of fluorescence obtained after a conventional indirect stain of the E-selectin transfectants using EL-246 (Figure 10F). These results showed that when neutrophils are pre-treated with EL-246, the mAb apparently has the capacity to transfer from the neutrophil to E-selectin on the L-cell transfectants. Similar results with endothelial cell E-selectin were obtained. Here, human umbilical cord endothelial cells were treated with 10 units/ml TNF for 4 hours to induce E-selectin expression. Neutrophils pretreated with EL-246 were added to the endothelial cells as described above. Within 15 minutes, all neutrophils lost EL-246 which could then be found on the surface of the cytokine-activated endothelial cells. This, EL-246 blocking of neutrophil binding to E-selectin was likely at the level of E- and not L-selectin. Furthermore, these results suggest that neutrophils may efficiently deliver EL-246 to sites of E-selectin expression.

30

Example 13

EL-246 blocks neutrophil "rolling" on activated human umbilical-cord endothelial cells (HUVECs)

Selectins are involved in recruitment of neutrophils and other leukocytes to sites of inflammation.

35

- 62 -

The recruitment of neutrophils to sites of inflammation can be divided into three steps: 1) initial attachment and "rolling" of cells on activated endothelium of postcapillary venules; 2) activation of neutrophils and firm adhesion to the endothelium; and 3) extravasation of the cells into the surrounding tissue (Paulson, J.C. 1992 Chapter 2, In: *Adhesion Its Role In Inflammatory Disease*, J.M. Harlan and D.Y. Liu (eds.) W.H. Freeman and Company, New York, NY, pp. 19-42). Selectins participate in the initial adhesion or "rolling" of neutrophils on the activated endothelium. Anti-adhesion therapy prevents or inhibits this damage.

Leukocyte traffic across the vessel wall to extravascular vascular tissue is necessary for host defense against microbial organisms or foreign antigens and repair of tissue damage. Under some circumstances, however, leukocyte-endothelial interactions may have deleterious consequences for the host. During the process of adherence and transendothelial migration, leukocytes may release products that directly damage endothelium, cause endothelial dysfunction and tissue damage. (Harlan, J.M. et al. 1992 Chapter 6. In.: Adhesion. Its Role In Inflammatory Disease, *ibid* pp. 117-150). Anti-adhesion therapy prevents or inhibits this damage.

An in vitro flow cells system that mimics in vivo shear force of blood flow in post capillary venules and neutrophils rolling, was used to determine the ability of EL-246 to inhibit neutrophil rolling on an activated endothelial cell layer.

Freshly isolated human umbilical-cord endothelial cells, which were Factor VIII and LDL-receptor positive, were grown to confluency on the internal surface of sterile glass 1.36 mm capillary tubes (Drummond Scientific, Broomall, Penn). Four hrs prior to the assay, the endothelial cells were treated with 10ng/ml PMA or 1ug IL-1 (IL-1 beta, Immunex, Seattle, WA) which induces maximal

35

- 63 -

° E-selectin expression. Tubing was attached to each end of the capillary tube to form a closed system in which fluid and cells could be recirculated using a variable peristaltic pump. The capillary tube was mounted on the stage of an inverted microscope modified for video microscopy. Purified
5 human neutrophils were injected into the system at a 1×10^7 cell/ml concentration in DMEM plus 2% FBS. A reproducible rolling interaction, which did not occur on nonactivated endothelial cells, was detected under a flow rate of 10.1 mm/sec. The rolling interaction was allowed to occur for 5
10 min while being videotaped, and then EL-246 or an isotype negative control antibody at 50 ug/ml or both were sequentially injected into the system. The leukocyte-endothelial cell interactions were then videotaped for up to 10 min. The number of neutrophils rolling on the activated
15 endothelial cells at 10-30 sec intervals before and after the injection of mAb was determined by analysis of each frame of the videotape recording. Data were recorded as the number of rolling cells within the field of view versus time (seconds).

20 EL-246 was tested to determine whether it could inhibit the ability of activated endothelial cells to support neutrophil rolling. HUVECs were grown on the internal surface of sterile glass capillary tubes and induced to express E-selectin (confirmed by EL-246
25 staining), as described. The tubes were set up in a system which measures leukocyte interactions with ligands under conditions of shear. The in vitro loop assay was used to analyze the effect of EL-246 on the capacity of neutrophils to roll on activated endothelial cells as described. A
30 rolling interaction was established and then EL-246 was injected into the system. The number of rolling neutrophils within the microscopic field of observation was quantified over time by analysis of individual frames from the videotape recording of the interaction. Under controlled
35

- 64 -

shear conditions, activated HUVECs were quite effective at supporting human and mouse neutrophil rolling (data not shown). To test the effect of EL-246, a rolling interaction between isolated human neutrophils was established and then EL-246 (50 ug/ml final concentration) was injected into the closed loop system, and the effect on neutrophil rolling recorded by videomicroscopy for 10 min. The number of neutrophils rolling on the endothelial cells was determined before and after the injection of EL-246 by analyzing individual frames of the videotape. Figure 11 A shows a plot of the number of cells rolling on the activated endothelial cells versus time. Within 90 seconds after the injection of EL-246, greater than 75% of the rolling interaction was blocked, and by 4 min the blocking was 100%. In tubes injected with medium alone, no inhibitory effect on the neutrophil rolling was detected. Furthermore antibodies to CD44 and P-selectin had no inhibitory effect in this assay (data not shown).

A second type of experiment was done to control for nonspecific effects of mAb on neutrophil rolling within the same tube eventually injected with EL-246. A rolling interaction was established as above and then an isotype negative control mAb (12.2, which does not recognize neutrophils or endothelium) was injected into the system (50 ug/ml) and its effect monitored for 150 sec. As shown in Figure 11B, 12.2 did not alter the rolling interaction. After 180 sec, EL-246 was injected into the system, which blocked rolling completely (Figure 11B). In some tubes, the lack of effect of the negative control mAb was seen for over 20 min (data not shown).

The results of these experiments demonstrate that EL-246 monoclonal antibody is unique in its ability to inhibit neutrophil rolling on activated endothelium and supports its use in vivo for inhibiting neutrophil rolling for prevention or inhibition of leukocyte migration and

35

- 65 -

inflammation.

Example 14

EL-246 blocks the ability of E-selectin cDNA transfectants to bind peripheral lymph-node HEV

5 Peripheral lymph node HEV binding Assay. The in vitro assay of lymphocyte binding to HEVs in frozen sections and the mouse pre-B L 1/2 cells transfected with E-selectin cDNA or vector cDNA were the same as used in Example 5. Mouse L 1/2 cells expressing functional human E-selectin and
10 the nontransfected control parent line were resuspended in cRPMI at 1×10^7 cells/ml and 100 μ l added to 10 μ m sections of mouse peripheral lymph node, and the HEV binding assessed. Cell binding was quantified by first identifying HEVs in each field by their characteristic autofluorescence
15 or unique plump morphology and then counting cells bound to HEV, as described in Example 5. After the assay, the sections were stained with thionin which preferentially labels the binding cells a dark blue. Data were calculated as number of cells bound per individually scored HEV. The
20 effect of antibody treatment on the transfectants was compared to medium alone.

Berg E.L., Robinson, M., and colleagues have shown that there are overlapping binding specificities between L- and E-selectin (Berg, E.L. et al. 1992 Biochem. Biophys. Res. Comm. 184:1048). Both molecules bind the same
25 carbohydrates and, interestingly, E-selectin transfectants avidly adhere to peripheral lymph-node HEV (Berg et al., ibid) a molecular interaction originally thought to be unique for L-selectin (Butcher, E.C. 1991 Cell 67:1033).
30 EL-246 was tested to determine if it blocked the interaction of the E-selectin transfectants with PLN HEV. As shown in the photomicrographs of Figure 12, the mouse L 1/2 lymphoma cell line, transfected with human E-selectin cDNA, avidly bound to mouse PLN HEV. EL-246 treatment of the

35

- 66 -

transfectants completely blocked this interaction (Figure 12). This experiment was repeated 4 times, and in each experiment the blocking of EL-246 was 100%.

Example 15

5 *EL-246 blocks the homing of lymphocytes into peripheral lymph nodes in vivo*

Xenogeneic lymphocyte in vivo homing assay.
Bovine lymphocytes were isolated from peripheral blood, washed, suspended at 1×10^7 cells/ml in HB101 (NEN), and
10 labeled with FITC as described (Jutila, M.A. et al. 1989, J. Immunol. 143:3318; Jutila, MA 1990 Cell Immunol. 132:201, incorporated herein by reference). These procedures led to 100% efficiency in homogeneously labelling all of the lymphocytes with resulting mode fluorescence values ranging
15 from 100-500. The FITC-labeled lymphocytes were washed in HBSS, resuspended at 1×10^8 cells/ml and 0.5 ml of the cell preparation injected into the lateral tail vein of 6-12 week old, female BALB/c mice. After 4 hrs, the animals were sacrificed and Peyer's patches (PP), mesenteric lymph nodes
20 (MLN), peripheral lymph nodes (PLN), spleen, and peripheral blood were collected. Single cell preparations were made from each tissue. RBCs in the peripheral blood were lysed by hypotonic lysis, and then flow cytometric analysis was done to quantify the capacity of the transferred lymphocytes
25 to enter lymphoid tissues of the mouse, as previously described (Jutila, M.A. 1990 Cell. Immunol. 132:201). The percentage of transferred versus host lymphocytes was determined for each tissue. The effect of antibody on the homing of the lymphocytes was compared to medium controls.
30 Additional controls in this assay were 1) quantifying blood levels to show that clearance of the antibody treated cells did not occur, and 2) the tissue specific effects of EL-246. L-selectin preferentially mediates lymphocyte homing through peripheral lymph nodes. To achieve optimal results, the

35

- 67 -

donor animals had to be healthy and less than 1 mo old (the age when L-selectin is expressed at its highest level on the greatest percentage of circulating lymphocytes). Furthermore, cell separation and labeling techniques could not take more than 2 hrs, otherwise there was a drop in cell viability. Assays were not included for analysis if xenogeneic lymphocyte homing in control animals (at least 0.2% of host peripheral lymph node lymphocytes, for example) did not occur.

The xenogeneic homing model was used to test whether EL-246 was effective at blocking lymphocyte homing into peripheral lymph nodes in vivo--another selectin-mediated function. Xenogeneic lymphocytes home with appropriate specificity to lymphoid tissues of mice in short-term homing assays (Bargatze, R. and Jutila, M.A., unpublished observations). This is not surprising since the primary adhesion pathways required for homing are highly conserved in mammals (Jutila, M.A. et al. 1992 J. Exp. Med. 175:1565; Spertini, O. et al. 1991 J. Immunol. 147:942; Wu, NW 1988 J. Cell. Biol. 107:1845; Walcheck, B. et al. 1992 Eur. J. Immunol. 22:469). The assay is completed within 4 hrs; thus, few complications related to xenogeneic responses are detected. This approach provides a powerful system to measure the homing capacity of lymphocytes from large animals in which homologous homing experiments are difficult due to the large numbers of cells required. Bovine lymphocyte homing in the mouse was examined because 1) EL-246 recognizes bovine L-selectin, 2) large numbers of cells can be easily obtained, and 3) healthy young animals (1 mo), in which virtually all circulating lymphocytes are L-selectin positive (as any animal matures the percentage of L-selectin positive lymphocyte drops), can be readily used.

MEL-246 or medium-alone-treated, FITC-labeled bovine lymphocytes were injected into identical mice and allowed to home for 4 hours. After the incubation, the

- 68 -

animals were sacrificed and blood and various lymphoid organs collected. The percentage of FITC-labeled cells compared to unlabeled host cells was determined for each tissue and compared between the various treatments. Table 2 shows the combined data from 7 different experiments (except for the Peyer's patch which was analyzed 3 times).

Table 2

EL-246 pretreatment of bovine lymphocytes blocks their ability to home to peripheral lymph nodes of the mouse.

Tissue	Percentage of host cells ^a		Percent blocking ^b
	Control	EL-246	
PLN	0.4±0.14	0.14±0.05 (P, 0.10)	65% (n=7)
MLN	0.48±0.22	0.24±0.08	50% (n=7)
PP	0.45±0.24	0.34±0.03	25% (n=3)
Spleen	1.54±0.63	1.30±0.50	15% (n=7)
Blood	0.66±0.32	1.10±0.55	No reduction (n=7)

^a Values represent the percentage of FITC-labeled cells in 50,000 cells analyzed from each tissue and are means ± SEM from the number of experiments indicated.

^b Percent blocking by EL-246 calculated as follows: 100 (100x percentage of cells in tissues following EL-246 treatment/percentage of cells in tissues of controls). Controls were cells treated with medium alone and then injected into the mice.

The percentage of FITC-labeled control lymphocytes found in the peripheral lymph node ranged from 0.2%-1.6%. As expected, there was variability (indicated by high SEM) in the level of homing between experiments which likely was due to variability in cell preparations, animals, and/or other factors. Even with this variation the pooled data from control and EL-246 peripheral lymph nodes were

- 69 -

° significantly different (65% inhibition, P value .10). If the percent inhibition within each experiment was calculated and averaged, far less variation was seen ($64\% \pm 10$ SEM, significant at a P value < 0.01). Blocking was also seen in all of the other tissues tested, but was only slightly
5 significant in the mesenteric lymph node (P value .30). The reduced homing after EL-246 treatment was not due to increased clearance of the treated cells from the circulation, since blood levels were the same in the two treatment groups (Table 2).

10 The effect of a negative control antibody (DREG55) was examined. This antibody is the same isotype and was prepared in the same manner as EL-246 but does not recognize bovine lymphocytes. The xenogeneic lymphocyte in vivo homing assay was done as described in Table 2, and the
15 effects of EL-246 and a negative control antibody (DREG55 same isotype as EL-246, but does not recognize bovine lymphocytes) were evaluated by flow cytometry. The contour plots shown in Figure 13 represent the analyses of this experiment and report the percentage of FITC-labeled bovine
20 lymphocytes that homed into spleen and PLN following treatment with EL-246, DREG 55, or medium alone (control). 50,000 cells were analyzed for each time point and the threshold for the contour levels were the same in each plot. The quadrants were based on the upper limit of background
25 fluorescence.

Figure 13 shows representative flow cytometric contour plots of the data collected from animals injected with medium alone, DREG55, and EL-246-treated, FITC-labeled cells. Again, EL-246 blocked homing to the peripheral lymph
30 node and slightly diminished accumulation in the spleen. DREG55 had no effect on the accumulation of cells in the PLN; however it affected accumulation in the spleen to the same extent as EL-246. Importantly, EL-246 blocked homing to PLN by 70% in comparison to the effect of DREG55, even
35

- 70 -

though there were 2 times the level of circulating EL-246-treated versus DREG55-treated cells in the test animals. These results show that EL-246 is an effective inhibitor of L-selectin in this in vivo model.

5

*Example 16**Treatment of Ischemia/Reperfusion*

EL-246 ameliorates or inhibits Ischemia/Reperfusion injury in vivo. Ewes of approximately 24-30 Kg weight were used in the experiments. The accepted lung ischemia/reperfusion model was followed as described by Kapelanski, D.P. et al. 1993 J. Heart Lung Transplant. 12:294-306, incorporated herein by reference. Briefly, general anesthesia was induced in the ewes with this penthal sodium and maintained by continuous administration of fentanyl citrate. Complete paralysis was sustained by continuous administration of pancuronium bromide.

15

Volume-controlled ventilation (tidal volume, 600 ml; fraction of inspired oxygen, 0.53; inspiratory:expiratory ratio, 1:1 positive end-expiratory pressure 5.0 cm H₂O) (608 ventilator; Harvard Apparatus, INC., S. Natick, Mass.; air-oxygen mixer; Sechrist Industries, Inc., Anaheim, Calif.; positive end-expiratory pressure valve; Boehringer Laboratories, Inc., Norristown, Pa.) was delivered through an 8-mm cuffed endotracheal tube. The ventilator rate (10 to 15/min) in donors was adjusted to achieve an arterial carbon dioxide tension (PaCO₂) of approximately 30 mm Hg. These ventilator settings were maintained for the remainder of the experiment.

20

25

Oxygen and carbon dioxide tension in blood and gas were measured with calibrated micro-Clark and Severinghaus electrodes (NOVA Biomedical Corporation) at 37° C. Blood pH was measured using a calibrated Sanz electrode (NOVA Biomedical Corporation) at 37° C. Blood gas tensions and pH were corrected to body temperature, pressure, saturated,

35

- 71 -

using the algorithms of Thomas, L.J. 1972 (J. Appl. Physiol. 33:154-8). Oxygen consumption (VO_2) was calculated from the arterial and mixed venous oxygen content difference and cardiac output. Carbon dioxide elimination (VCO_2) was calculated from carbon dioxide tension in mixed-expired gas and expired minute ventilation, assuming carbon dioxide was not present in inspired gas. VO_2 and VCO_2 were indexed to body weight and converted to STPD.

Continuous ventilation:perfusion (VA/Q) distributions were estimated using the multiple inert gas elimination technique as described in Wagner, PD et al. 1974. (J. Appl. Physiol. 36:588-99) and Wagner PD et al. 1974 (J. Appl. Physiol. 36:600-5). The inert gases were extracted from blood by equilibration with nitrogen at 37° C. Inert gas concentrations in the gas phase were determined by gas chromatography, using megabore columns (DB1, J&W Scientific, Folsom, Calif.; Poraplot U, Chrompack, Middleburg, The Netherlands) and a flame ionization and electron capture detector-equipped machine (Hewlett-Packard Co., Medical Products Group, Andover, Mass.)

A three hour period of left lung ischemia was initiated in 19 animals by occlusion of the left main pulmonary artery. EL-246, which recognizes both sheep L- and E- selectin, and DREG 56, which recognizes the lectin domain of human L-selectin, were infused into 8 and 3 animals, respectively, 10 minutes prior to reperfusion of the left lung. Each animal received a bolus infusion in 0.9% saline solution, intravenously, at a dose of 1 mg antibody/Kg body weight. Eight animals received no antibody treatment. Physiological parameters were recorded for all subjects at various time intervals for up to 6 hours following onset of reperfusion.

Five out of eight untreated animals (62.5% mortality) died within 6 hours as shown in Figure 14. All

35

- 72 -

of the untreated animals (ischemic controlled) showed a loss of lung function within 30 minutes following onset of reperfusion, which declined progressively throughout reperfusion. Loss of lung function was indicated by a decline in arterial oxygen tension (P_{aO_2}) with an increase in arterial carbon dioxide tension (P_{aCO_2}).

Two out of three DREG 56-treated animals (66.7% mortality) died within 6 hours as shown in Figure 14. All of the DREG 56 treated animals showed a loss of lung function throughout the experiment. These results were not statistically different from the untreated controls. Therefore, DREG 56, which recognizes the lectin domain of L-selectin in humans and bovines, but does not recognize L-selectin in sheep, failed to protect sheep from ischemia/reperfusion injury.

All eight of the EL-246 treated animals (zero percent mortality) survived throughout the entire experiment (Figure 14). All of the EL-246 treated animals demonstrated an immediate loss in lung function (within 30 minutes) following onset of reperfusion. However, within 2 hours the lung function in all EL-246 treated animals improved significantly to levels of P_{aO_2} and P_{aCO_2} found in the blood of normal animals. Therefore, EL-246 is an effective therapeutic in vivo as it resulted in 100% survival of treated animals, as well as improved lung function.

Example 17

Determination of saturating levels of antibody in the serum of treated animals

Serum from treated animals (See Example 15) was tested 30 minutes after injection of EL-246 or DREG 56 for saturating levels of antibody. Staining of E-selection and L-selection cDNA transfected mouse L1/2 cells by flow cytometry was used for these analysis. Serial 2 fold dilutions of the serum samples were used to stain the

- 73 -

transfectants, followed by FITC-second stage and the fluorescence compared to that given by saturating levels of purified EL-246 or DREG 56 antibody. Maximal staining of the transfectants was detected in all serum samples diluted 1:8 (both EL-246 and DREG 56) indicating that saturating levels of antibody were achieved in the animals.

Example 18

1/2 life of EL-246 in circulation

The titer of EL-246 in the serum of the eight treated animals was followed throughout the 6 hr experiment (Example 15). No significant drop in the level of EL-246 was noted. Figure 15 shows the percent of maximal staining of L-selectin transfectants treated with different dilutions of the serum samples taken from the eight animals at 30, 90, 360 minutes following onset of reperfusion. Saturating levels of EL-246 following the injection of 1mg/kg were maintained for 6 hrs, though variability in the titers at 6 hrs were noted (Figure 15). Thus EL-246 was not rapidly cleared from the circulation.

It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims.

30

35

- 74 -

I Claim:

1. The monoclonal or antigen binding fragment thereof, capable of recognizing a common antigenic determinant found on E-selectin and L-selectin.

2. The monoclonal antibody EL 246, or antigen binding fragment thereof secreted by a hybridoma having the ATCC Accession No. HB11049.

3. A method of inhibiting the adhesion of a first cell bearing a first selectin molecule to a second cell bearing a second selectin molecule, said selectin molecules being different, comprising:

contacting said cells with the antibodies or antigen-binding fragments of claim 1 under conditions wherein the antibodies bind to the cells in an amount sufficient to prevent the first cell from binding to the second cell.

4. The method according to claim 3, in which the selectins are E-selectin and L-selectin.

5. The method according to claim 3, in which the monoclonal antibody is EL-246 secreted by a hybridoma having the ATCC Accession No. HB11049.

6. A cell line which secretes the monoclonal antibody according to claim 1.

7. The cell line having the ATCC Accession No. HB11049 which secretes the monoclonal antibody according to claim 2.

8. A method of detecting E-selectin and L-selectin bearing cells in biological sample suspecting of containing the selectin bearing cells comprising:

- a. contacting the sample with the antibodies or antigen-binding fragments of claim 1 to form an immune complex with the E-selectin and L-selectin bearing cells, and
- b. detecting the presence of the immune

- 75 -

complex.

9. A method for diagnosing inflammatory diseases comprising the method according to claim 8.

10. A method of treating a mammal with the intent of reducing tissue damage occurring at an inflammatory site in any part of the body of a mammal experiencing leukocyte-mediated inflammatory condition, said method comprising:

administering *in vivo* a monoclonal antibody in an amount sufficient to bind specifically to the of selectin molecules expressed on the surface of leukocytes and endothelial cells to inhibit the adhesion of said cells.

11. The method according to claim 10 in which said inflammatory site is located at the vascular endothelial cell interface or subcellular matrix of a body part.

12. The method according to claim 10 in which said inflammatory site involves endothelial tissue of a body part.

13. The method according to claim 10 in which said inflammatory site is in as joint of a body part.

14. The method according to claim 10 in which said inflammatory site is the result of a myocardial infarct.

15. The method according to claim 10 in which the monoclonal antibody is administered intravenously at a selected time period to or during said inflammatory condition.

16. The method according to claim 10 in which said monoclonal antibody binds to L-selectin and E-selectin expressing cells and does not bind to P-selectin.

17. A method of treating a mammal with the intent of reducing tissue damage occurring at an inflammatory site in the body of the mammal experiencing an inflammatory condition, said method comprising:

- 76 -

infusing into the body prior to or during said inflammatory condition a quantity of monoclonal antibody sufficient to bind specifically to an epitope expressed on the short consensus region express on the surface of leukocytes and which will inhibit the adhesion dependent intercellular reactions of leukocytes reflecting their immunological response function which contributes to such damage.

18. A pharmaceutical composition comprising the monoclonal antibody or antigen binding fragment according to Claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

19. The monoclonal antibody or antigen binding fragment according to claim 1, wherein the antibody or antigen binding fragment does not bind to P-selectin.

20. The monoclonal antibody or antigen binding fragment according to claim 1, wherein the antibody or antigen binding fragment selectively binds to L-selectin in humans, sheep, goats, cattle, and pigs.

21. The monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof according to claim 1 wherein the antibody or antigen binding fragment is capable of inhibiting leukocyte rolling on an endothelial cell layer.

22. The monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof according to claim 1 wherein the antibody or antigen binding fragment is capable of inhibiting lymphocyte homing to peripheral tissues.

23. The monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof according to claim 1 wherein the antibody or antigen binding fragment is capable of inhibiting an inflammatory response in humans, sheeps, goats, cattle and pigs.

24. A monoclonal antibody capable of recognizing a common antigenic determinant found an E-selectin and L-

35

- 77 -

selectin produced by a process comprising:

(a) immunizing a mammal with an immunogen composed of E-selectin, L-selectin or a combination of E-selectin and L-selectin;

5 (b) fusing lymphocytes from the immunized mammal with myeloma cells;

(c) selecting hybrid cells that secrete antibodies that recognize a common antigenic determinant on L-selectin and E-selectin; and

(d) isolating the antibodies.

10 25. A process for producing monoclonal antibodies capable of binding to a common antigenic determinant on E-selectin and L-selectin comprising:

15 (a) immunizing a mammal with an immunogen composed of E-selectin, L-selectin or a combination of E-selectin and L-selectin;

(b) fusing lymphocytes from the immunized mammal with myeloma cells;

20 (c) selecting hybrid cells that secrete antibodies that recognize a common antigenic determinant on L-selectin and E-selectin; and

(d) isolating the antibodies.

25 26. A method of preventing or inhibiting an inflammatory response at a site in a mammal, said method comprising:

administration of an effective amount of a monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, said antibody or antigen binding fragment capable of binding to L-selectin and E-selectin, said amount prevents or inhibits the inflammatory response at the site.

30 27. The method according to claim 26 wherein the site is selected from the group consisting of a heart, lung, joint, brain, limb, blood vessel, lymph node, spleen, crush injury site, spinal cord or transplantation site.

35 28. The method according to claim 26 wherein the

- 78 -

inflammatory response is caused by a myocardial infarction, shock, stroke, organ transplantation, crush injury, limb replantation, frostbite or lung ischemia/reperfusion injury.

29. The method according to claim 26 wherein the monoclonal antibody has a reactivity pattern similar to EL-246 which is secreted by a cell line having the ATCC. Accession No. HB 11049.

30. A method to prevent or inhibit leukocyte rolling on an endothelial cell layer comprising:

treatment of the leukocytes or the endothelial cell layer with an amount of the monoclonal antibody or antigen binding fragment according to claim 1, said amount is effective to prevent or inhibit leukocyte rolling.

31. The method according to claim 30 wherein the endothelial cell layer is in a lymphatic vessel, artery, vein, or postcapillary venules.

32. A method to prevent or inhibit lymphocyte homing to peripheral tissue of a mammal comprising:

administration of an effective amount of the monoclonal antibody or antigen binding fragment according to claim 1, said amount prevents or inhibits the homing of lymphocytes from the blood to the peripheral tissue.

33. The method according to claim 32 wherein the peripheral tissue is Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, peripheral lymph nodes, or spleen.

1/20

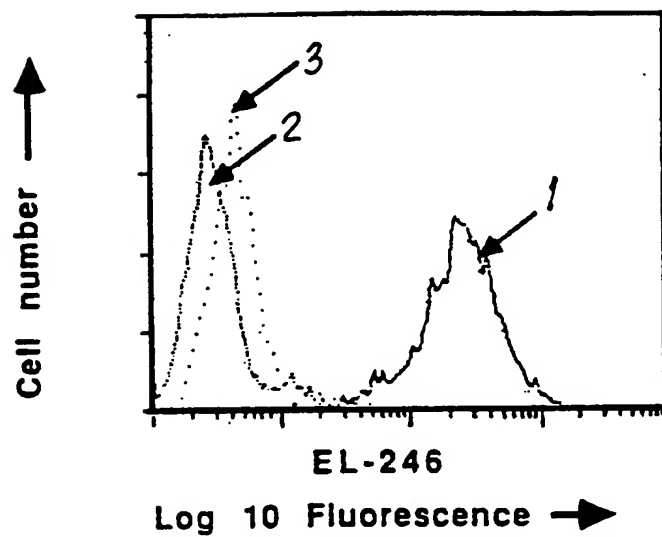


FIG. 1

2/20

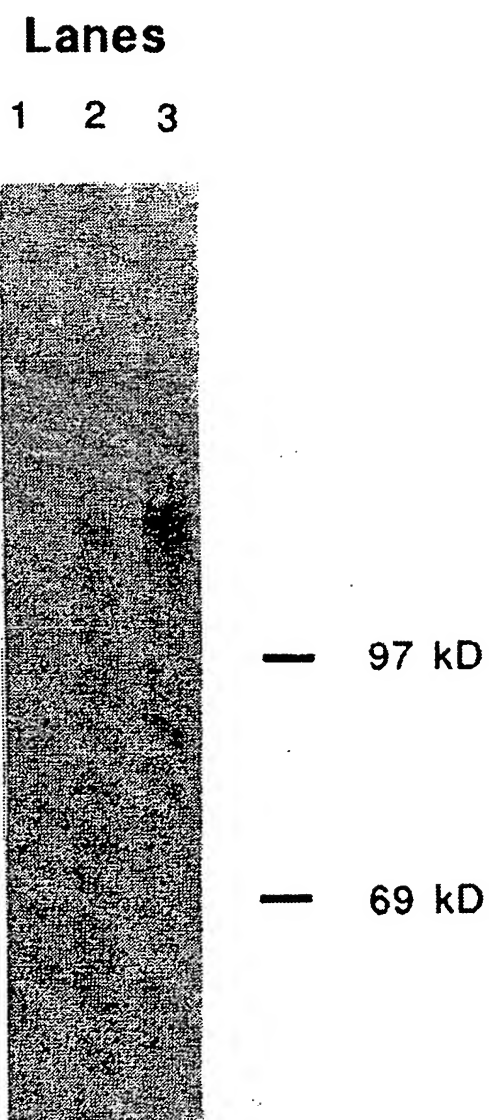


FIG. 2

3/20

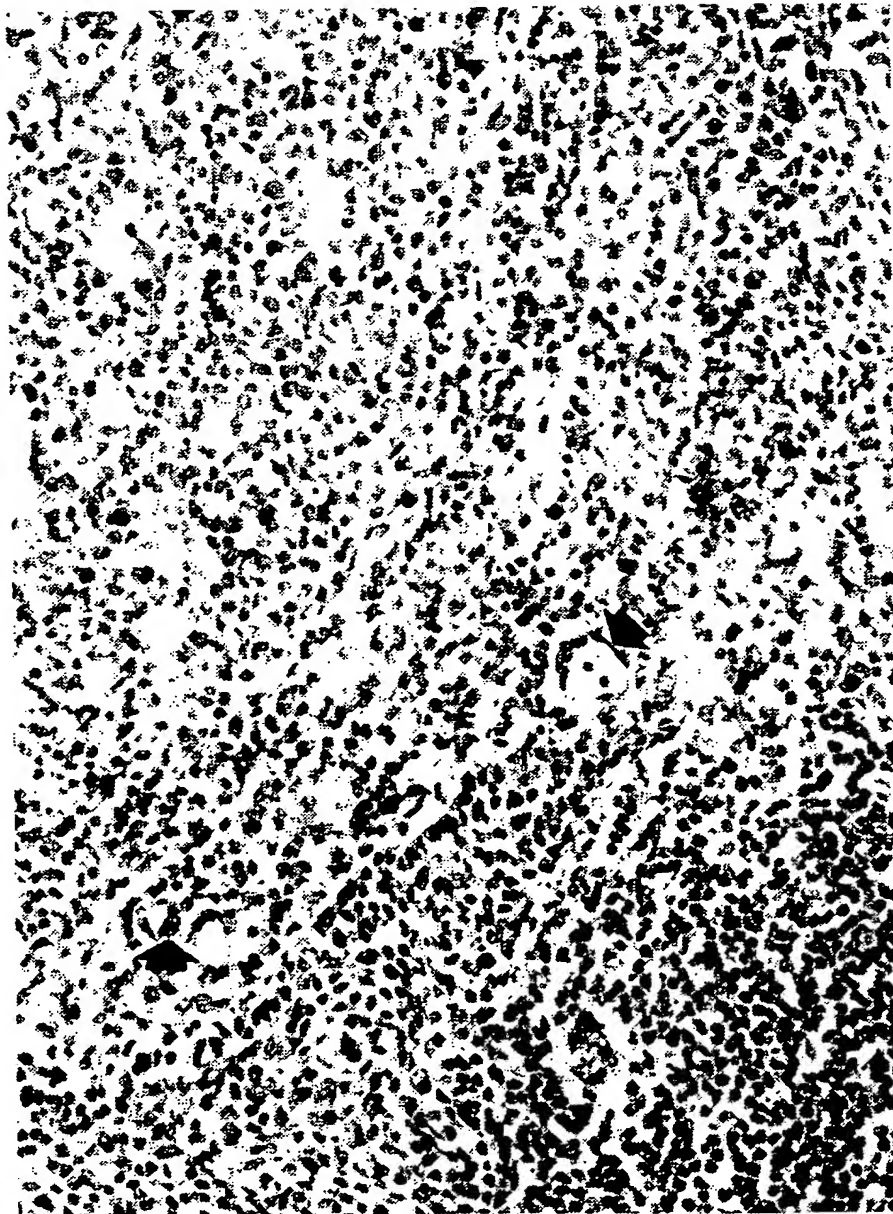


FIG. 3

4/20

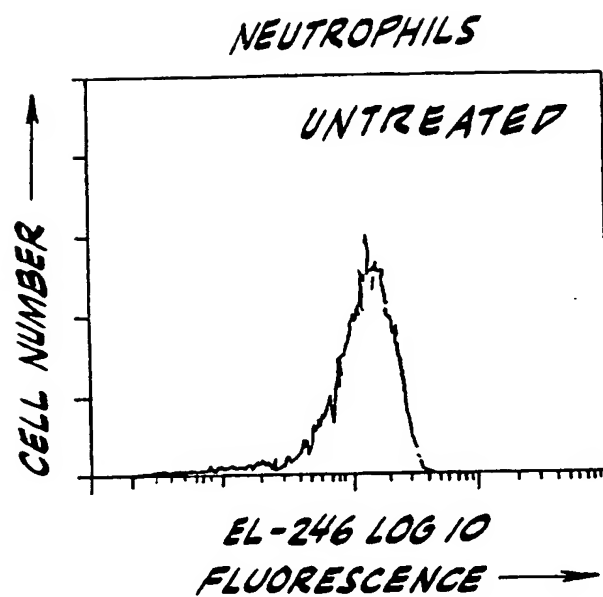


FIG. 4A

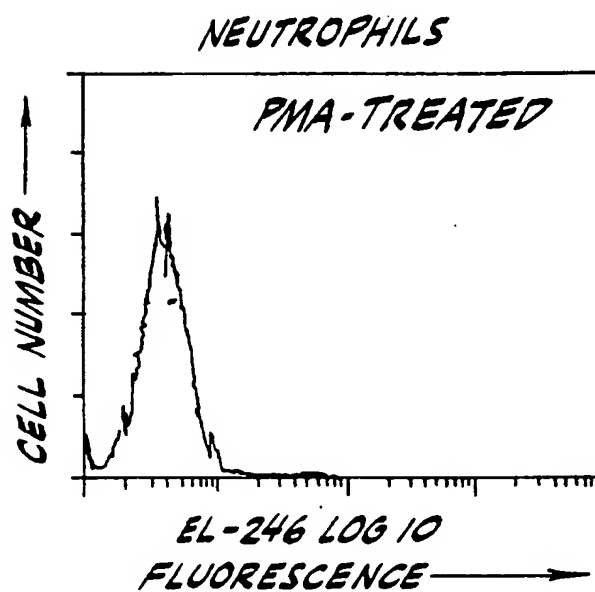


FIG. 4B

5/20

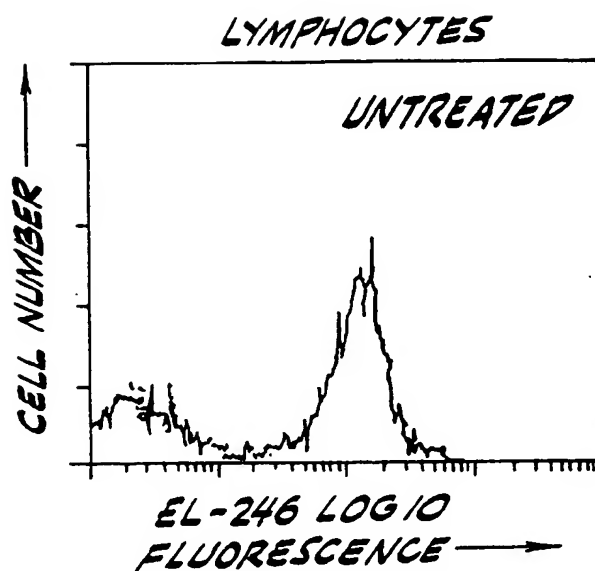


FIG. 4 C

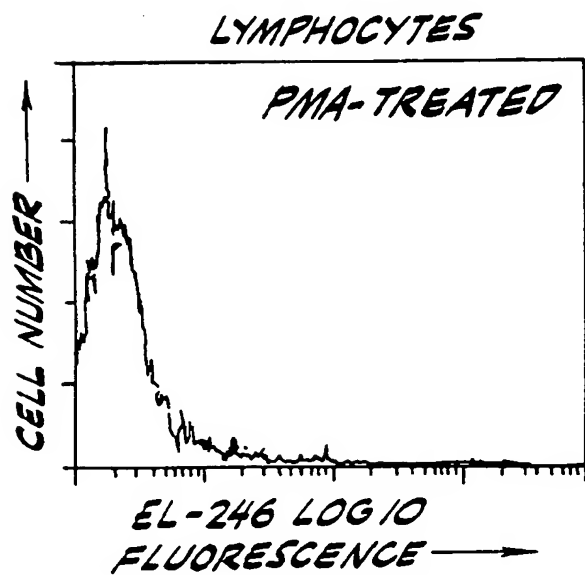


FIG. 4 D

6/20

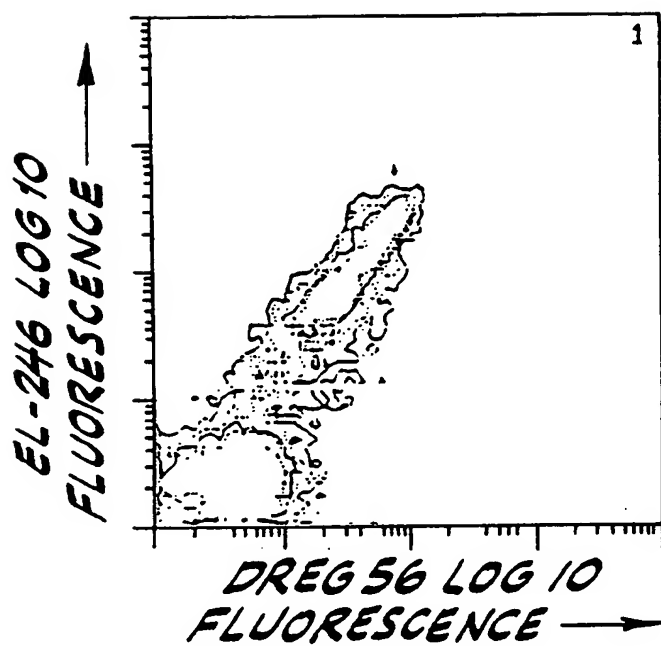


FIG. 5

7/20

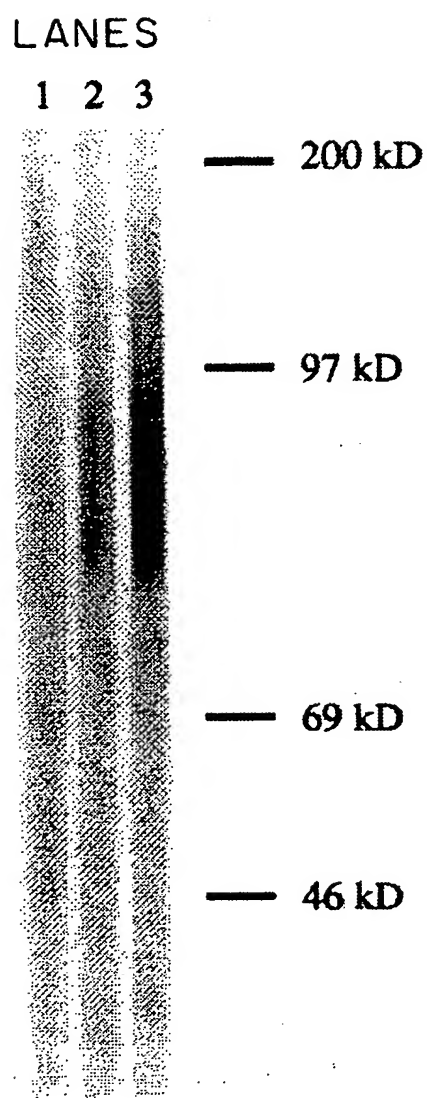


FIG. 6

8/20

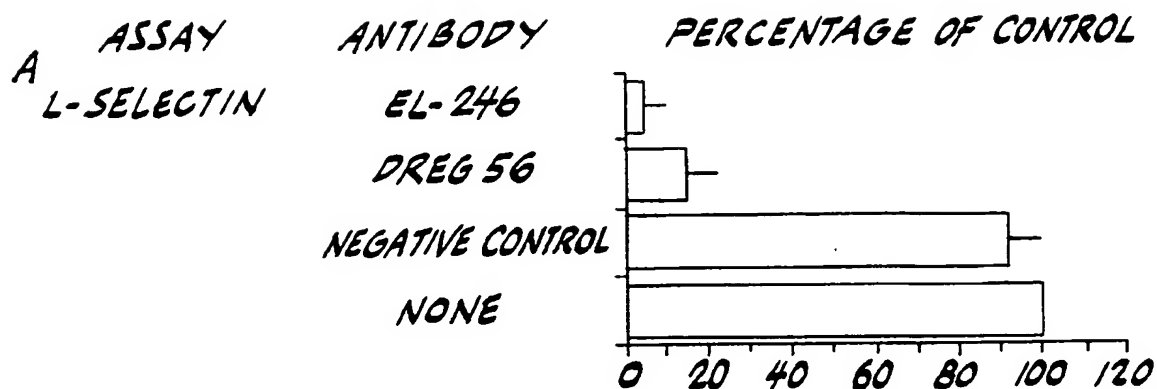


FIG. 7A

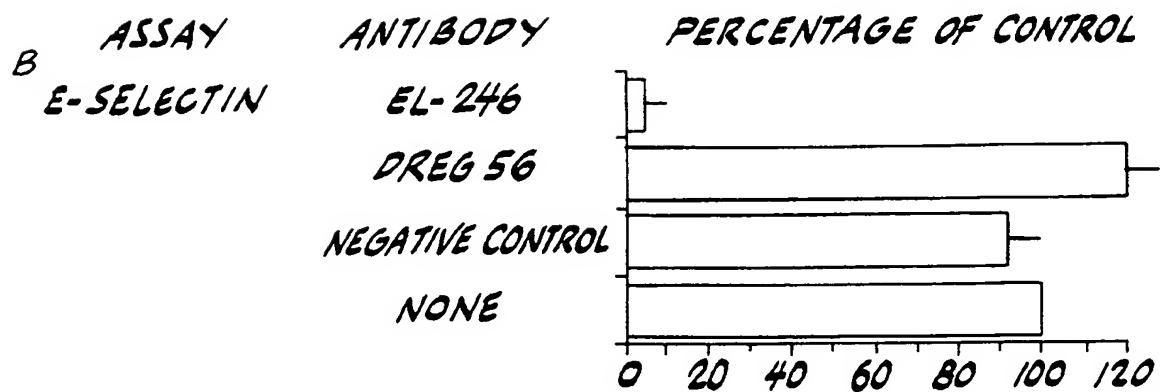


FIG. 7B

9/20

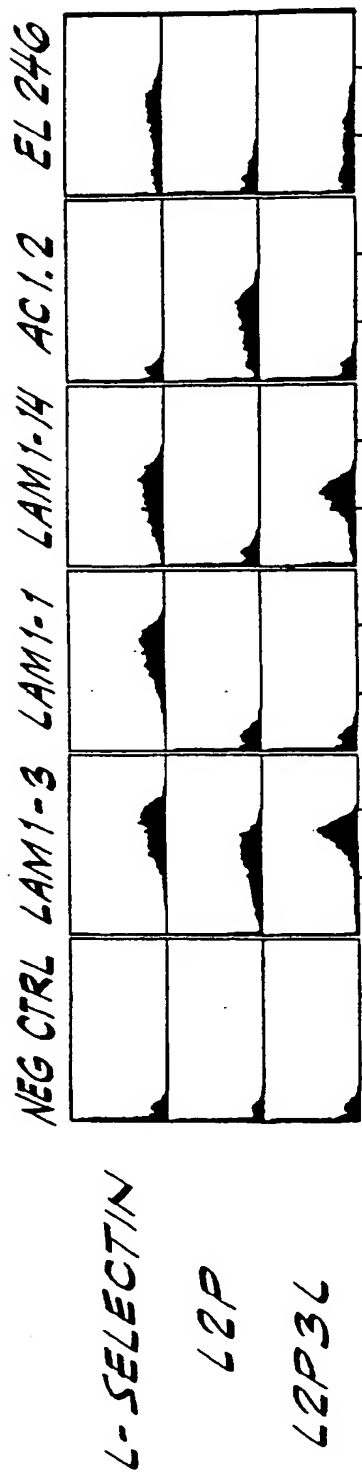


FIG. 8

10/20

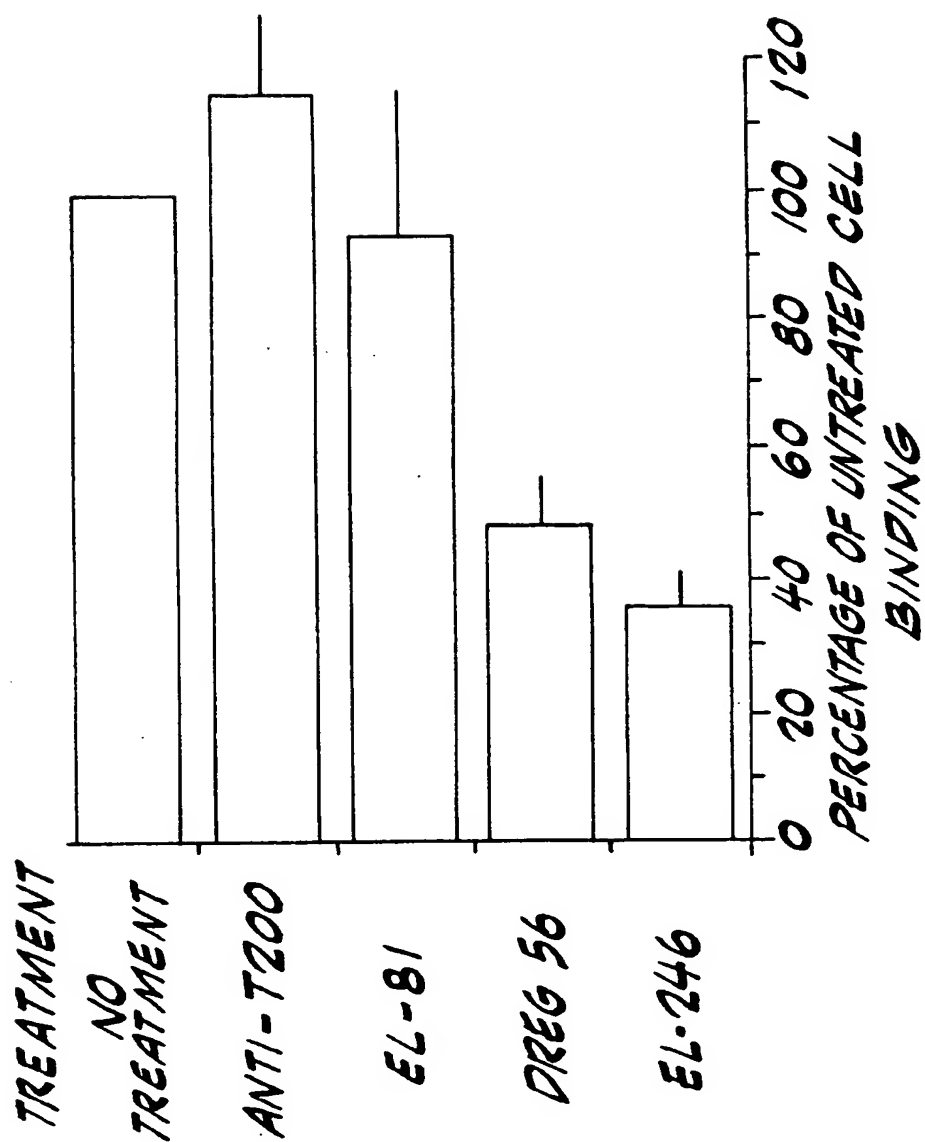


FIG. 9

11/20

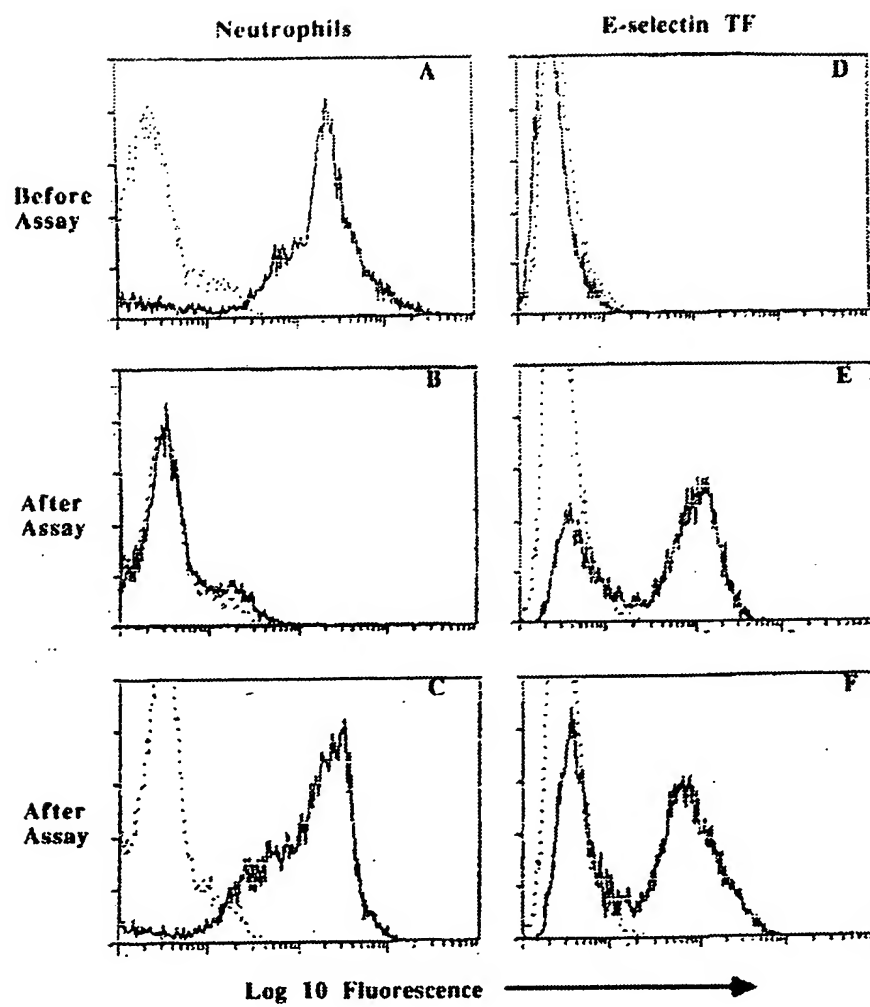


FIG. 10

12 / 20

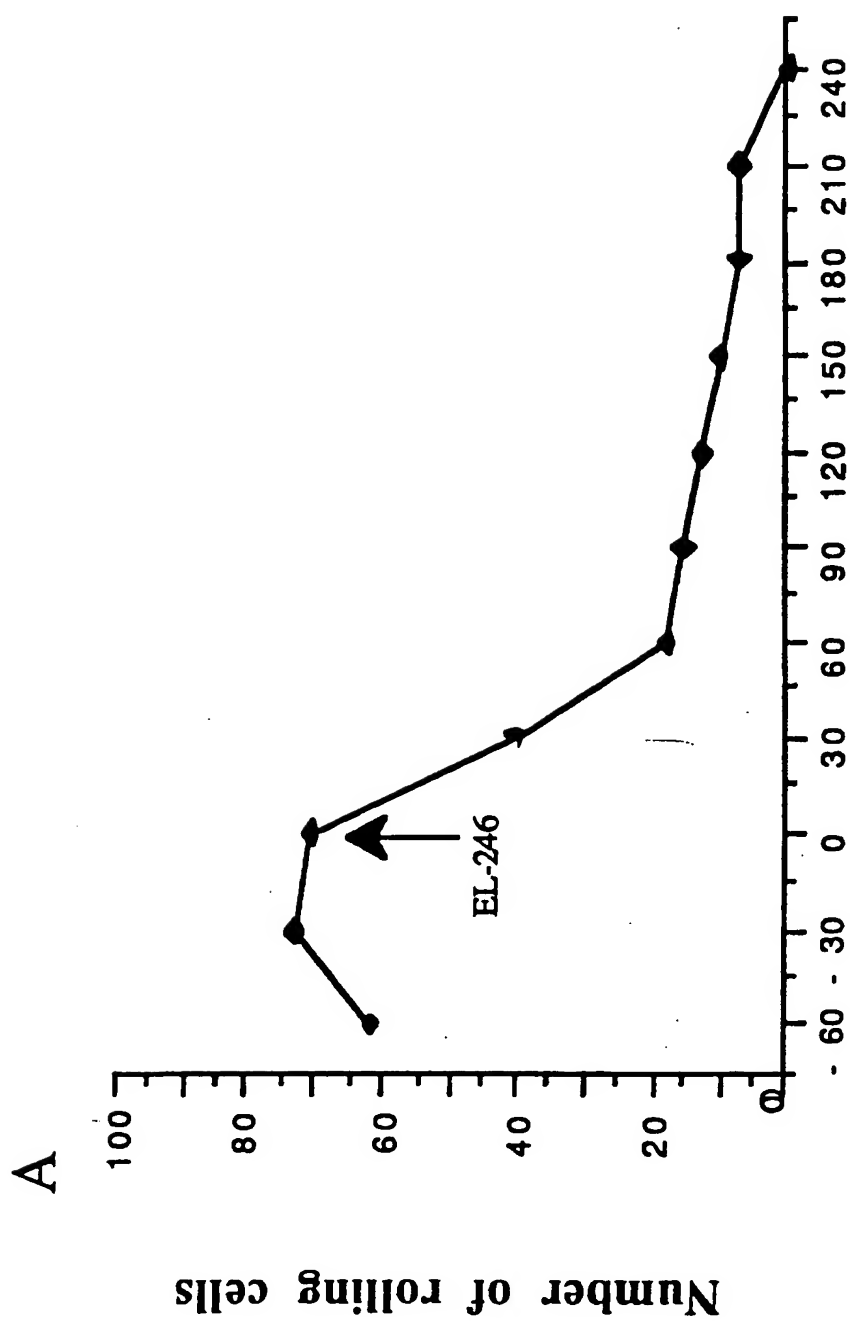


FIG. 11A

13/20

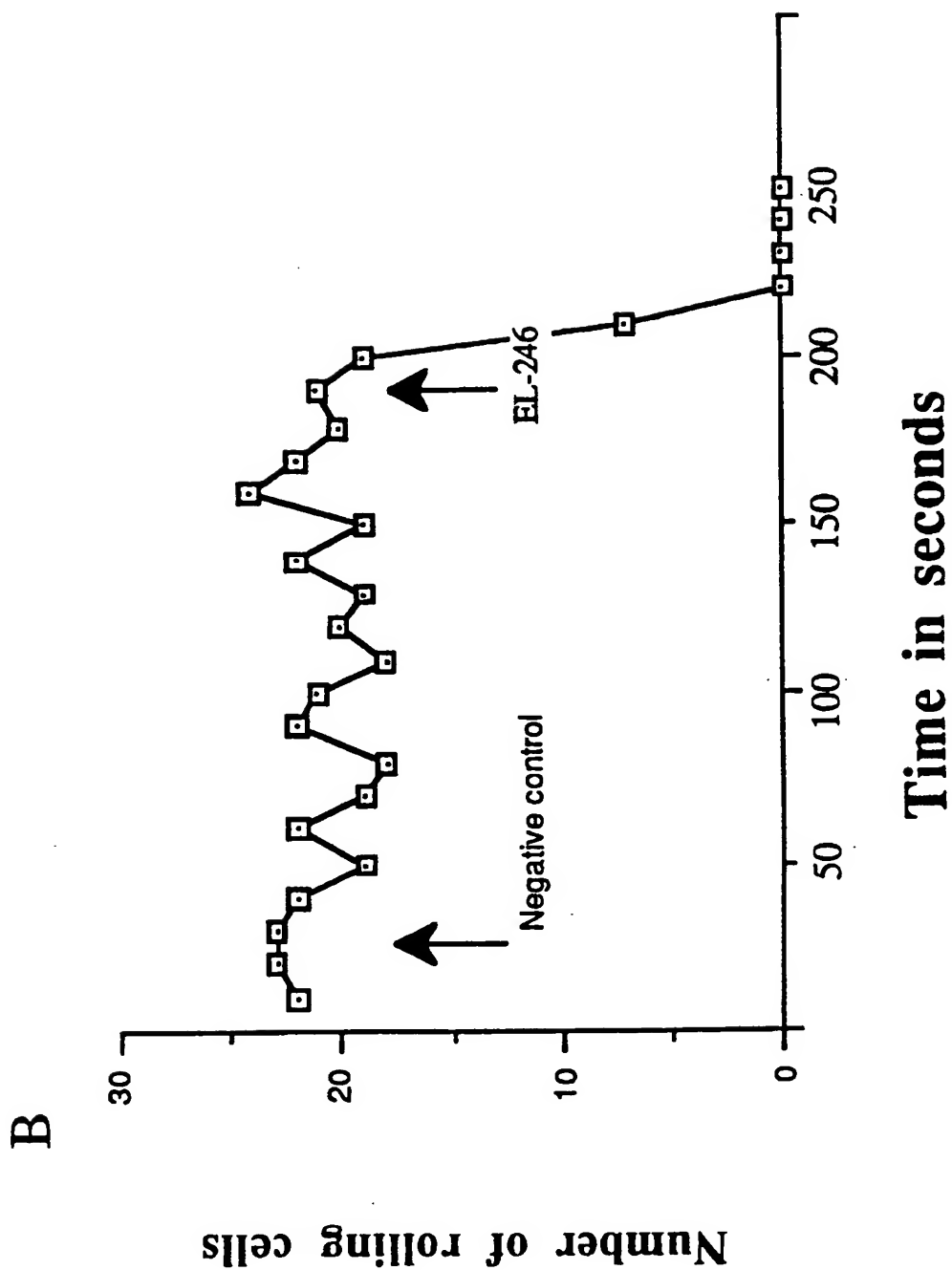


FIG. 11B

14/20



FIG. 12A

15/20

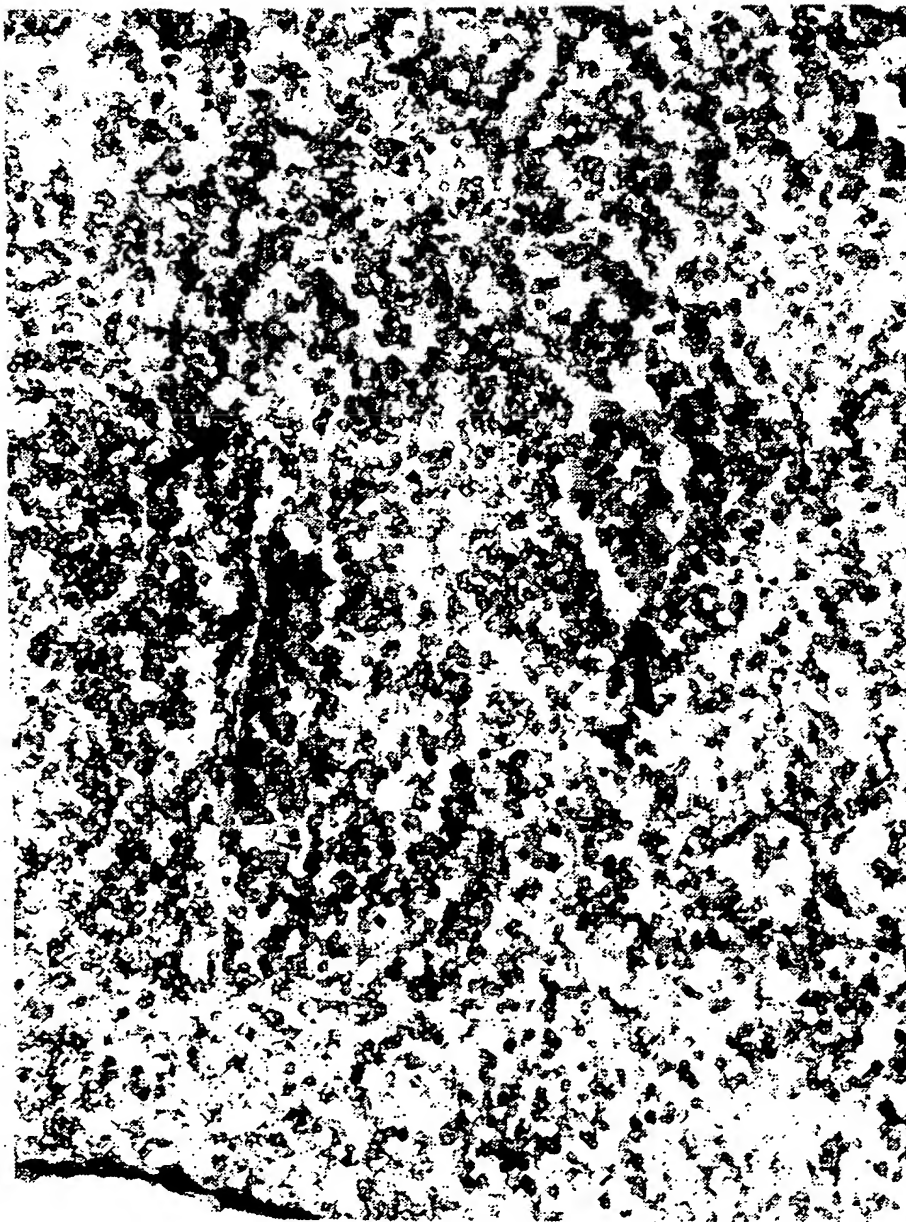


FIG. 12B

16/20

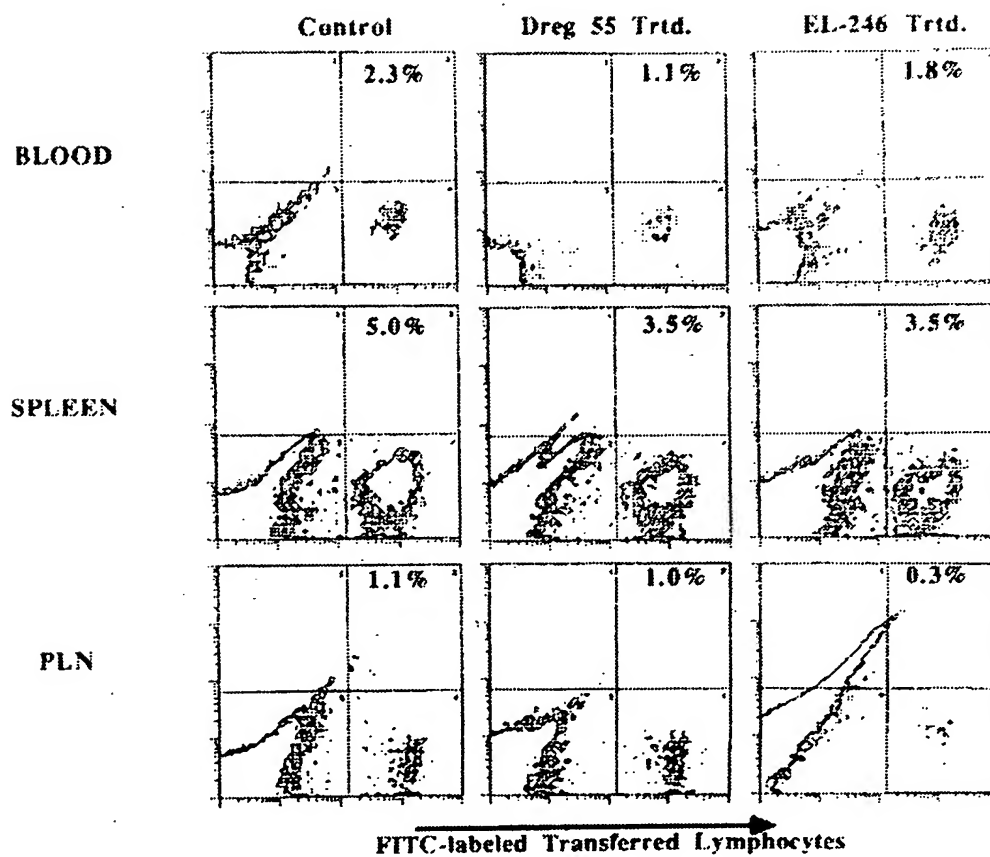


FIG. 13

17/20

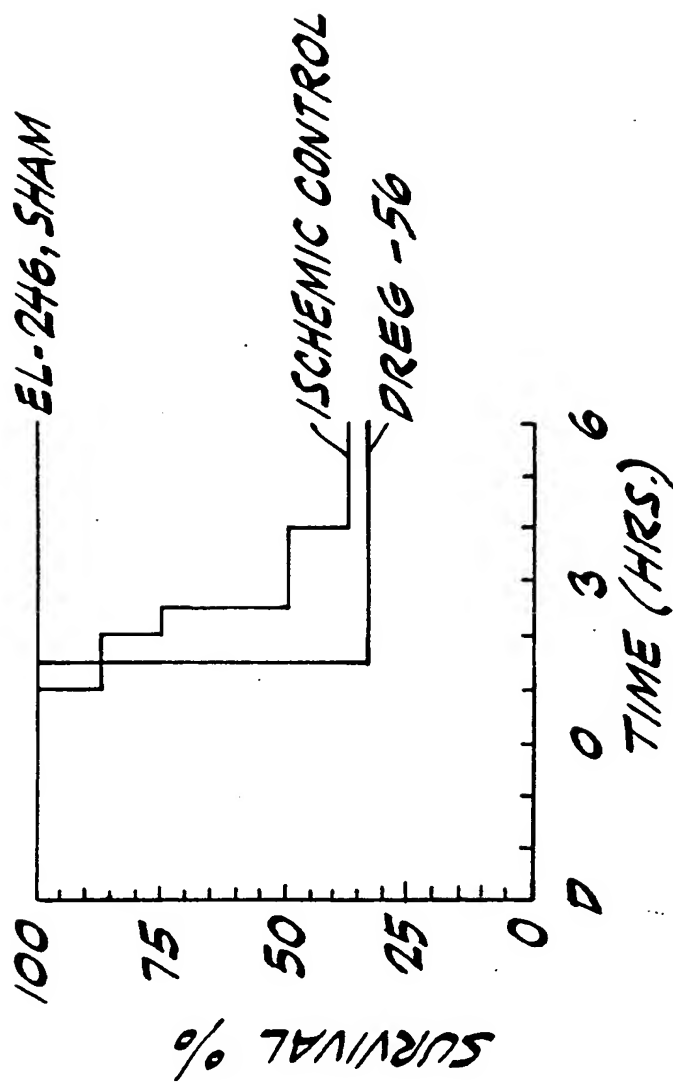


FIG. 14

18/20

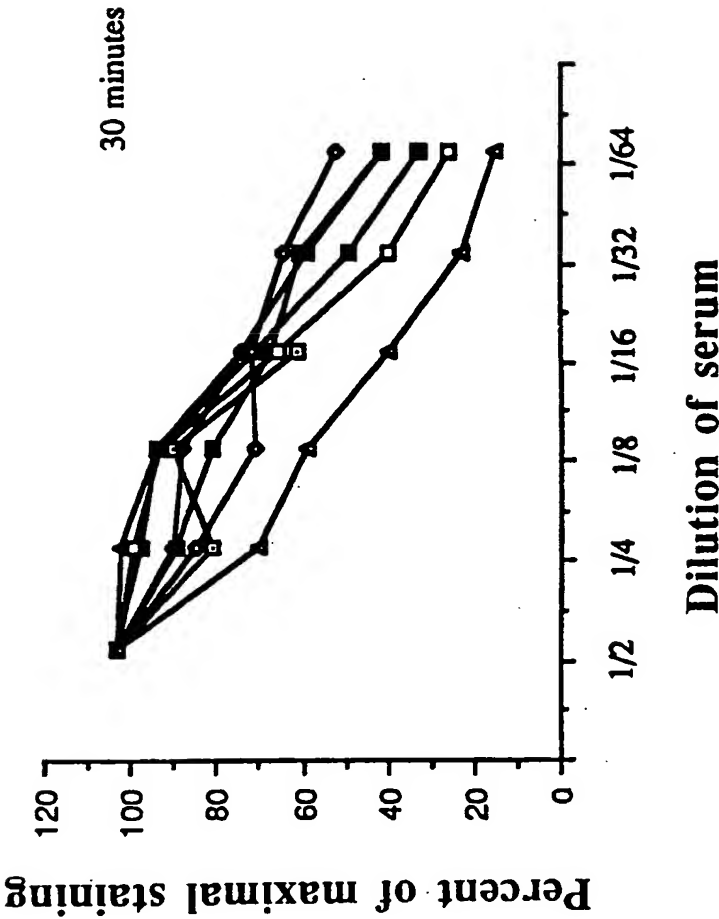


FIG. 15A

19/20

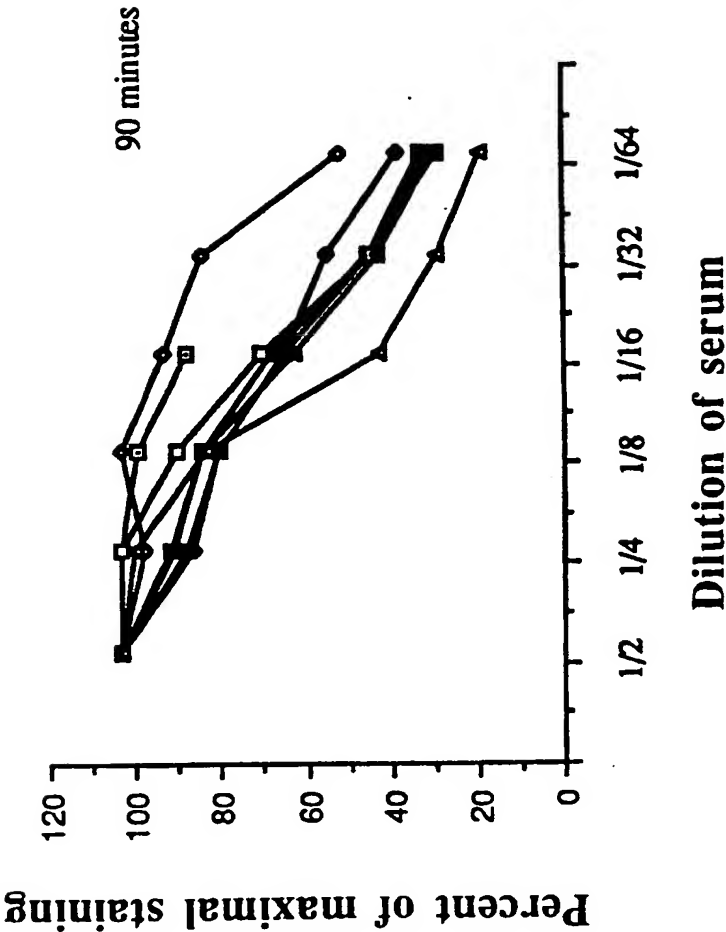


FIG. 15B

20/20

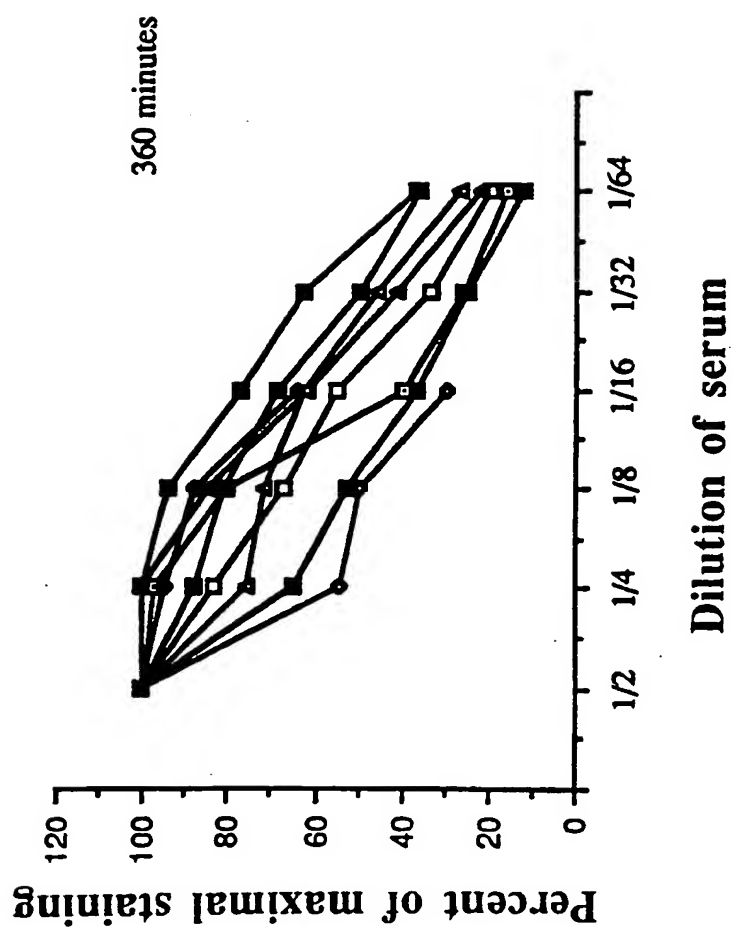


FIG. 15C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : Please See Extra Sheet.

US CL : 435/240.27, 70.21, 7.21; 530/388.2; 424/85.8; 536/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/240.27, 70.21, 7.21; 530/388.2; 424/85.8; 536/27

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Medline, BIOSIS, EMBASE, CAS Online, WPI

search terms: E-selectin, L-selectin, antibody, LAM-1, ELAM, inflammation, treatment

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Proceedings of the National Academy of Science, Volume 87, issued March 1990, T.K. Kishimoto et al., "Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule", pages 2244-2248, see entire document.	1-33
Y	US, A, 5,098,833 (Lasky) 24 March 1992, see entire document.	1-33
Y	The Journal of Cell Biology, Volume 115, Number 1, issued October 1991, S.R. Watson et al., "The complement binding-like domains of the murine homing receptor facilitate lectin activity", pages 235-243, see entire document.	1-33
Y	E. Harlow, "Antibodies: a laboratory manual", published 1988, by Cold Spring Harbor Laboratory (New York), pages 72-77, 92-97, 128-135, and 141-157, see entire document.	1, 2, 6, 7, 18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T	Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*&*	document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

26 July 1993

Date of mailing of the international search report

16 AUG 1993

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

JACQUELINE G. KRIKORIAN

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04999

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	Science, Volume 258, issued 06 November 1992, L.A. Lasky, "Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation", pages 964-969, see entire document.	1-33
Y,P	Journal of Experimental Medicine, Volume 175, issued June 1992, M.A. Jutila et al., "Characterization of a functionally important and evolutionarily well-conserved epitope mapped to the short consensus repeats of E-selectin and L-selectin", pages 1565-1573, see entire document.	1-33
Y	US, A, 4,935,234 (Todd et al.) 19 June 1990, see entire document.	10-17, 26-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/04999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (5):

C12N 5/18; C12P 21/08; C07K 15/28, C07H 15/00; A61K 39/395; G01N 33/577

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/04999

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(Telephone Practice)

- I. Claims 1-7, 18-25, 30, and 31, drawn to a first composition and a first method of use, classified in Class/subclass 530/388.2 and 435/7.21.
- II. Claims 8 and 9, drawn to a second method of use, classified in Class/subclass 424/3.
- III. Claims 10-17, 26-29, 32, and 33, drawn to a third method of use, classified in Class/subclass 424/85.8.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.